

DER EINFLUSS DER KRYOCHIRURGIE
AUF TUMORWACHSTUM
UND ZELLULÄRE ZUSAMMENSETZUNG
DER MILZ BEI RATTEN UND MÄUSEN

Michael Römis

Disbui. München

1987



**AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG DER UNIVERSITÄT
MÜNCHEN**

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Brendel

**DER EINFLUSS DER KRYOCHIRURGIE AUF TUMORWACHSTUM UND ZELLU-
LÄRE ZUSAMMENSETZUNG DER MILZ BEI RATTEN UND MÄUSEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Römisch

aus
München

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: ..Prof. Dr. Dr. C. Hammer.....

Mitberichterstatter: ..Prof. Dr. Dr. W. Brendel.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: ..Dr. C. Lersch.....

Dekan: ..Prof. Dr. Dr. W. Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung: ..10.12.1987.....

A. EINLEITUNG	4
B. MATERIAL UND METHODEN	6
I. MATERIAL	6
1. Tiere	6
a. Long Evans Ratten	6
b. NMRI Mäuse	6
c. NMRI nu/nu (nackte) Mäuse	7
2. Tumoren	9
a. Walker 256 Karzinom	9
b. Lewis Lung Karzinom (3LL)	9
c. Aufbereitung der Tumoren	10
3. Antikörper	10
a. Ratte	10
b. Maus	11
4. Kryochirurgiesystem	12
II. METHODEN	14
1. Milztransposition	14
2. Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB)	14
3. Morphologische Zelldifferenzierung	15
4. Immunfluoreszenz	16
a. Allgemeines	16
b. Direkte Immunfluoreszenz	17
c. Indirekte Immunfluoreszenz	18
d. Auswertung	19
5. Statistische Berechnung	21

C. VERSUCHSBE SCHREIBUNGEN UND	
ERGEBNISSE	22
I. TUMORWACHSTUM BEI LONG EVANS RATTEN OHNE	
KRYOTHERAPIE	22
1. Versuchsaufbau	22
2. Ergebnisse	22
II. KRYOTHERAPIE VON TUMOREN BZW. HAUT BEI	
LONG EVANS RATTEN	31
1. Versuchsgruppe tumortragender Long Evans Ratten	31
a. Versuchsaufbau	31
b. Ergebnisse	31
a. Totalremission	32
b. Tumorrezidiv	39
2. Kontrollgruppe tumorfreier Long Evans Ratten	45
a. Versuchsaufbau	45
b. Ergebnisse	45
III. KRYOTHERAPIE VON TUMOREN BEI NU/NU NMRI MÄUSEN	
UND +/+ NMRI MÄUSEN (BEHAARTE MÄUSE)	53
1. Versuchsaufbau	53
2. Ergebnisse	53
D. DISKUSSION	60
I. DER TUMORIZIDE EFFEKT DER KRYOCHIRURGISCHEN	
BEHANDLUNG	60
1. Die physikalisch-chemische Wirkung	60
2. Die Voraussetzungen der immunologischen	
Reaktion	62

II. VERSUCHE	63
1. Tumorwachstum bei Long Evans Ratten ohne Kryotherapie	63
2. Kryotherapie von Tumoren bei Long Evans Ratten	64
3. Kryotherapie von Tumoren bei nu/nu NMRI Mäusen und +/+ NMRI Mäusen	68
E. ZUSAMMENFASSUNG	69
F. LITERATURVERZEICHNIS	70

A. EINLEITUNG

Die Behandlung oberflächlicher Geschwülste durch Vereisung fand bereits um die Jahrhundertwende Eingang in die medizinische Fachliteratur (White 1899-Epitheliome, de Quervain 1917-Blasenpapillome). Einer weiter ausgedehnten klinischen Anwendung jedoch standen lange Zeit mangelhafte technische Voraussetzungen entgegen, bis Cooper 1963 ein neues Gerät beschrieb, welches die Anwendung von Kälte erstmals unter einfachen, kontrollierbaren Bedingungen ermöglichte (25) und weitgehend unverändert noch heute benutzt wird. Inzwischen bedienen sich fast alle chirurgischen Disziplinen der Vorteile kryochirurgischer Operationsmethoden vor allem bei der Behandlung benignen, prämaligen und malignen, oberflächlicher Zellveränderungen (45). Sichere, zuverlässig nekrotisierende, anästhesierende und hämostatische Wirkung bei kontrollierbarem und reproduzierbarem Anwendungsmodus läßt die Kryochirurgie gerade bei Patienten mit hohem Risiko oder inoperablem Tumor als sinnvolle Alternative zur Operation erscheinen. Der Eingriff ist meist ambulant durchführbar, das nekrotische Gewebe verbleibt bis zu seiner Abstoßung in situ und schützt so die darunterliegenden Schichten (20, 25, 27, 39, 45, 63).

Ein anderer, zunehmend ins Licht gerückter Aspekt ist, daß Kryochirurgie über die Wirkung am Ort der Anwendung hinaus eine systemische Immunantwort gegen das vereiste Gewebe induzieren kann. Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, daß durch Vereisung von Organen des Fortpflanzungsapparates (Prostata, Samenbläschen, Hoden) eine humorale und zelluläre Autoimmunreaktion gegen körpereigene Strukturen ausgelöst werden kann, die für das jeweils behandelte Gewebe spezifisch ist (6, 7, 21, 23, 47, 74, 93). Klinisch bedeutsamer jedoch scheint, daß Gleiches auch für die Kryotherapie maligner Tumoren zutrifft.

Wie zahlreiche Untersuchungen an Tieren und menschlichem Patientengut

belegen, kommt es nach kryochirurgischer Behandlung von Krebs häufig zu einer Verbesserung der Parameter zellulärer und humoraler Immunität, vermindertem Auftreten von Metastasen und bisweilen sogar zur Rückbildung bereits etablierter Tochtergeschwülste (2, 5, 11, 13, 14, 17, 18, 20, 29-32, 34-36, 38, 39, 49, 58, 62-66, 78).

In der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik München-Großhadern wurden zwischen 1976 und 1984 263 Patienten mit Rektumkarzinomen äußerst erfolgreich kryochirurgisch behandelt (27). Bei 76% der Patienten konnten IgM-Antikörper gegen den Tumor nachgewiesen werden (39). Bei den parallel zur klinischen Studie durchgeführten Rattenversuchen zeigte Ganghoff (38), daß die Kryotherapie eines Walkerkarzinomsarkoms bei Einzeltumoren in 90%, bei Zwillingtumoren in 37% zur totalen Tumoremision führte. Eine erneute Inokulation von Tumorzellen (Challenge) nach Abheilung der Nekrosen konnte in keinem der Tiere wiederholtes Tumorstadium hervorrufen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang zur bisher veröffentlichten Literatur und scheinen auf immunologischen, tumorspezifischen Mechanismen zu beruhen (17, 20, 30, 31, 65, 66, 70). In derselben Studie konnte - wie auch in Arbeiten anderer Autoren (30, 71) - durch Transferversuche von Lymphozyten die Milz als wichtigster Ausgangspunkt der Abwehrreaktion lokalisiert werden.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist nun, in Verlaufsuntersuchungen die zellulären Bestandteile der Milz unter Tumorstadium und Kryotherapie morphologisch wie funktionell zu analysieren und den Einfluß humoraler bzw. zellulärer Komponenten des Immunsystems bei der Tumoremision zu untersuchen.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. MATERIAL

1. Tiere

a. Long Evans Ratten

Die Long Evans Linie entstand 1915 in Berkeley, indem Long eine wilde Norweger Ratte mit einem Wistar Weibchen kreuzte. Seit 1960 werden die Tiere im Netherlands Cancer Institute in Inzucht gehalten, so daß sie als syngen zu betrachten sind, d. h. Haut- und Tumortransplantate untereinander nicht abstoßen. Das Gewicht einer erwachsenen Ratte liegt geschlechtsabhängig zwischen 250 und 400 Gramm, die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt 2 1/2 bis 3 Jahre (15).

Die in den Versuchen verwendeten Ratten befanden sich in der 57.-63. Inzuchtgeneration des Institutes und wogen bei einem Alter von ca. 5 Monaten etwa 300 Gramm. In einem Käfig befanden sich maximal 3 Tiere, denen Leitungswasser und Futter (22 mm Standarddiätpellets*) ad libitum angeboten wurden. Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit unterlagen konstanten Bedingungen (22°C und 55% rel. Luftfeuchtigkeit). Die Kunstlichtbeleuchtung alternierte im 12h/12h Hell-Dunkel-Rhythmus.

b. NMRI Mäuse

1937 erhielt Poiley von Lynch Schweizer Mäuse, mit denen er an den

* Altromin, Kempten, BR Deutschland



National Institutes of Health eine neue Inzuchtlinie gründete, die unter dem Namen NIH/PI bekannt war und seit ihrer Weitergabe an das U.S. Naval Medical Research Institute in der 57. Inzuchtgeneration NMRI genannt wird. NMRI Mäuse sind ebenfalls syngen, Abstoßungsreaktionen bei Haut- oder Tumortransplantationen treten nicht auf. Die Tiere wiegen im Schnitt zwischen 30 und 35 Gramm und werden ca. 2 Jahre alt (16).

Die für die Experimente benutzten Mäuse hatten ein durchschnittliches Alter von 3 Monaten und ein Gewicht von 33 Gramm. Bis zu 5 Tiere wurden in einem Käfig untergebracht, ansonsten entsprachen die Haltungsbedingungen denen der Long Evans Ratten.

c. NMRI nu/nu (nackte) Mäuse

Die nu/nu (nackte) Maus ist die 1962 aufgetretene Mutation einer Laboralbinomaus, welche sich durch fehlendes Fell sowie Thymusaplasie auszeichnet. Das hierfür verantwortliche, autosomal-rezessive Gen wurde von Flanagan "nu" genannt, homozygote nackte Mäuse werden daher als nu/nu Mäuse bezeichnet.

Bezüglich ihres Immunsystems besitzt die nackte Maus ein normal ausgeprägtes B-Zell-System. 43% aller Milzzellen sind Immunglobuline auf ihrer Oberfläche exprimierende (Ig +) B-Lymphozyten, was den Werten normaler Mäuse entspricht. Bedingt durch die Thymusaplasie findet sich bei der nackten Maus jedoch ein massiver T-Zell-Defekt. Nur 2 - 5% aller Milzzellen tragen auf ihrer Oberfläche das für T-Lymphozyten typische Θ -Antigen (Θ +) gegenüber 50 - 80% bei normalen behaarten Mäusen. Diese sogenannten "T-ähnlichen" Zellen sind bis jetzt hinsichtlich ihrer Funktion nur mangelhaft erforscht und scheinen mit zunehmendem Alter in höherem Maße aufzutreten (19).

Daß die Inzidenz von Spontantumoren und die Angehrate transplantabler Tumoren bei weitem nicht so hoch sind, wie man zunächst erwartet hatte, liegt an einer dritten Gruppe von Lymphozyten, welche keine Immunglobuline und das Θ -Antigen nicht oder nur sehr schwach auf ihrer Oberfläche zeigen. Diese Zellen sind entweder Natural Killer (NK-) Zellen, die imstande sind, Tumorzellen direkt zu lysieren, oder Killer (K-) Zellen, welche die sogenannte antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ausüben, d. h. mit Antikörpern markierte Tumorzellen zerstören können. In der Milz liegt ihr Anteil bei ca. 20%.

Nackte Mäuse sind auf Grund ihres Immundefekts durch Infektionen extrem gefährdet und werden deshalb in möglichst keimarmer Umgebung gehalten. Ihre durchschnittliche Lebenserwartung liegt mit 9 Monaten deutlich unter der behaarter NMRI Mäuse, erwachsene Tiere wiegen zwischen 30 und 35 Gramm (16, 37).

Das Alter der in den Experimenten benutzten nackten Mäuse lag bei ca. 3 Monaten, ihr Gewicht betrug im Schnitt 32 Gramm. Da nackte Mäuse vermehrt zu Kannibalismus neigen, wurden pro Käfig nur bis zu 3 Tiere untergebracht, denen vitamin- und tetracyclinhaltiges Wasser sowie keimfreies Futter (Standarddiätpellets für nackte Mäuse*) ad libitum angeboten wurden. Um die Gefährdung durch Krankheitserreger möglichst gering zu halten, befanden sich die Käfige in einem von den übrigen Tieren abgetrennten Raum und waren dort in sogenannten "laminar air flow units" untergebracht, welche die nackten Mäuse mit gefilterter Luft versorgten. Die Raumtemperatur lag mit 25°C etwas höher als bei behaarten Mäusen, da durch die Haarlosigkeit der nu/nu Maus ihre Wärmeverluste zwangsläufig höher sind. Die relative Luftfeuchtigkeit wurde um 55% gehalten, die Kunstlichtbeleuchtung alternierte im 10h/14h Hell-Dunkel-Rhythmus.

* Altromin, Kempten, BR Deutschland

2. Tumoren

a. Walker 256 Karzinosarkom

Dieser Tumor entstand 1928 spontan im Brustdrüsengewebe einer trächtigen Albinoratte im Labor von George Walker der Johns-Hopkins-Universität. Er läßt sich subkutan bei einer Angehrate von fast 100% inokulieren, wächst lokal infiltrierend in das umliegende Gewebe und metastasiert innerhalb von 2 Wochen in die regionalen Lymphknoten, während hämatogene Fernmetastasierung nur äußerst selten in die Lunge erfolgt.

Histologisch setzt sich das Walker 256 Karzinosarkom aus 3 Komponenten zusammen: Karzinomatöse epitheliale Zellen, undifferenzierte epitheliale Zellen und sarkomatöse Spindelzellen (15, 79).

Der Tumor ist antigen und vermag spezifische Transplantationsimmunität zu induzieren (38).

b. Lewis Lung Karzinom (3LL)

Das Lewis Lung Karzinom ist ein maligner Tumor, der 1951 spontan als Lungenkarzinom einer C57 BL/6 Maus auftrat und seither in Serienpassagen erhalten wird. Subkutan inokuliert besitzt der Tumor eine Angehrate von fast 100%, wächst lokal infiltrierend und metastasiert regelmäßig nach ca. 1 Woche in die Lunge der Maus. Radikale Exzision des Primärtumors ändert zu diesem Zeitpunkt nichts mehr am tödlichen Verlauf. Die Mäuse sterben nach ungefähr 30 Tagen am fortgeschrittenen Tumorwachstum.

Mikroskopisch handelt es sich beim Lewis Lung Karzinom um ein anaplastisches, pleomorphzelliges Karzinom, das ebenfalls in der Lage ist, tumorspezifische Transplantationsimmunität zu erzeugen (54, 55, 77).

c. Aufbereitung der Tumoren

Die in Einfriermedium* tiefgekühlten Tumorzellen wurden nach langsamem Auftauen zwei Empfängertieren subkutan in die Flanke injiziert und begannen dort ihr Wachstum. Vor der Verwendung der Tumoren in den Versuchen erfolgten jedoch noch mindestens zwei weitere Tierpassagen. Entnommen wurden die Tumoren unter sterilen Bedingungen bei einer Größe von etwa 2 cm (3LL) bzw. 4 cm (Walker 256), da sie zu diesem Zeitpunkt noch frei von Nekrosen sind. Zuletzt diente ein hitzesterilisiertes Metallgitter zur mechanischen Zerkleinerung. Die Suspension der Tumorzellen geschah mit Hank'scher Lösung und wurde so eingestellt, daß 0,2 ml 1×10^7 Zellen enthielten. Die vor Versuchsbeginn durchgeführte Prüfung der Tumorzellen mit Trypanblau ergab regelmäßig eine Vitalität von ca. 90%.

3. Antikörper

a. Ratte

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper (51) ist es möglich, auf Grund unterschiedlicher Oberflächenantigenstrukturen Lymphozyten in Untergruppen aufzuteilen, welche bestimmten Funktionen dieser Lymphozyten entsprechen (22, 56, 57, 91). Zellen, welche dieselbe Antigenstruktur auf ihrer Oberfläche exprimieren, erfüllen auch dieselbe Funktion. Folgende monoklonale Antikörper** fanden bei den Experimenten Anwendung:

* 10% FCS (Böhringer, Mannheim, BR Deutschland), 10% DMSO (Merck, Darmstadt, BR Deutschland), 80% RPMI (Seromed, Berlin, Deutschland), 1% Pen-Strep (Gibco Ltd., Paisley, UK)

** sera-lab, Crawley Down, UK

Antikörper	Markierte Zellen
T-gesamt	Alle T-Lymphozyten
W 3/25	Helfer T-Lymphozyten
Ox 8	Zytotoxische/Suppressor T-Lymphozyten
Ox 6/HL	B-Lymphozyten, selten auch Monozyten und Granulozyten

Tab.1 Monoklonale Antikörper und durch sie markierte Lymphozyten-subpopulationen.

Sämtliche der aufgelisteten monoklonalen Antikörper sind Mäuseimmunglobuline der IgG-Klasse und nicht fluoreszeingekoppelt. Um die markierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop erkennbar zu machen, war deshalb noch ein zweiter, fluoreszeingekoppelter, polyvalenter Antikörper gegen Mäuseimmunglobuline der IgG-Klasse erforderlich (Anti-Maus-Gamma-Globulin, FITC-konjugiert*) (40).

b. Maus

Um die B-Lymphozyten von den übrigen Lymphozyten (s. I.1.c.) zu unterscheiden fand ein fluoreszeinkonjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin** Verwendung, das sämtliche Zellen markiert, die auf ihrer Oberfläche Immunglobuline exprimieren.

* Tago Inc., Burlingame, USA

** Behring Institut, Marburg/Lahn, BR Deutschland

4. Kryochirurgiesystem

Die Applikation von Kälte kann auf verschiedene Arten erfolgen. Als Mittel zum Wärmeentzug können Substanzen aller drei bekannten Aggregatzustände angewendet werden, also feste, flüssige und gasförmige Stoffe.

Ferner differenziert man zwischen kapazitiv begrenzten Systemen, wie z. B. dem in flüssigen Stickstoff eingetauchten Wattebausch zur Warzenbehandlung in der Dermatologie, und kapazitiv unbegrenzten Systemen, in denen immer neue Kältesubstanz an den Ort der Kälteapplikation herangeführt wird, beispielsweise Hohlsonden, die von Flüssiggas durchströmt werden. Ihr Vorteil liegt in der Möglichkeit, während der Vereisung an der Sondenspitze konstante Temperaturen aufrechtzuhalten.

Zuletzt kann man noch unterscheiden zwischen offenen Systemen, mit denen flüssiges Gas direkt auf Oberflächen gesprüht werden kann, und geschlossenen Systemen, in welchen das kühlende Agens von einem Mantel umschlossen ist (45).

Das in den Versuchen benutzte Gerät* ist ein kapazitiv unbegrenztes, geschlossenes System, das mit flüssigem Stickstoff betrieben wird. Es erzielt Temperaturen bis zu maximal -196°C und entspricht weitgehend dem von Cooper (25) 1963 erstmals beschriebenen Apparat (s. Abb. 1).

*Erbokryo PS, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, BR Deutschland

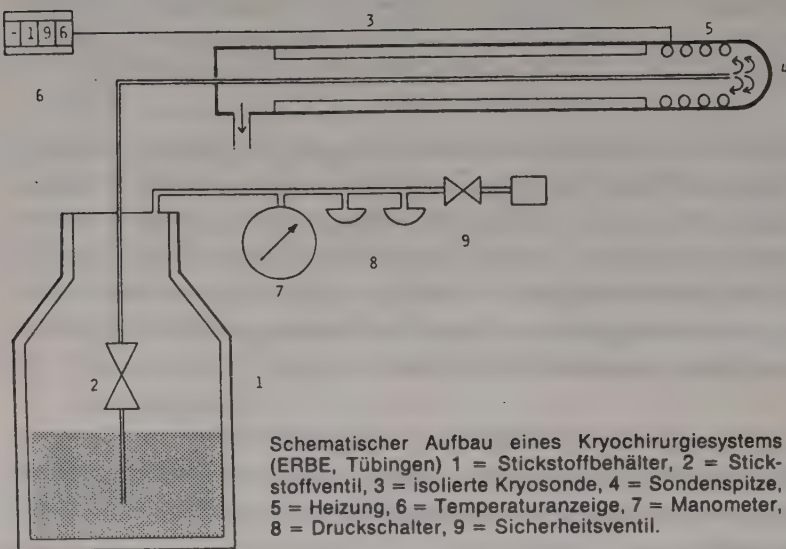


Abb.1 Schematischer Aufbau eines Kryochirurgiesystems

Aus einem Vorratsbehälter wird flüssiger Stickstoff in eine dünne Rektumsonde ($\varnothing$ 1 cm) aus hochwärmeleitendem Metall geführt, um dort zu verdampfen. Das entstandene Gas wird dann wieder abtransportiert und entweicht über ein Auslaßventil ins Freie. Sämtliche Bestandteile des Stickstofftransportsystems sind bis auf die Sonde vakuumisoliert; die Temperatur wird mit Sensoren an der Sondenspitze gemessen und kann über die Durchflußgeschwindigkeit des Stickstoffs geregelt werden.

II. METHODEN

1. Milztransposition

Etwa drei Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Milzen der Tiere bei Erhaltung der Vaskularisation subkutan gelegt, um sie einer Punktion leichter zugänglich zu machen (53, 89). Unter Betäubung der Tiere durch Äther erfolgte die Eröffnung des Abdomens über einen linksseitigen Subcostalschnitt. Nachdem mit spreizenden Scherenbewegungen eine ausreichend große Loge zwischen Cutis und Subcutis präpariert war, wurde die Milz aus dem Bauchraum herausmobilisiert, und die Abdominalmuskulatur um den Hilus herum mit einer Tabaksbeutelnaht soweit verschlossen, daß eine einwandfreie Perfusion der Milz gewährleistet war. Zuletzt wurde die Milz in die zuvor geschaffene Loge placiert, und die Haut mit drei Einzelknopfnähten verschlossen (sämtliche Fäden nicht resorbierbares, geflochtenes und atraumatisches Nahtmaterial 4/0*). Zwei Wochen später waren die Operationswunden vollständig verheilt.

2. Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB)

Die Feinnadelaspirationsbiopsie wurde als Methode der Tumordiagnostik bereits 1921 von Philips beschrieben und bietet zwei Vorteile: Zum einen müssen die Versuchstiere zum Zeitpunkt der Milzprobenentnahme nicht mehr getötet werden, was bei den Versuchen zu einer Einsparung von 90% führte. Zum anderen ist es möglich, ein einheitliches Versuchstierkollektiv über das gesamte Experiment hin zu beobachten, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einzelner Versuchstage enorm erhöht. Wie andere zytologische Methoden jedoch auch erlaubt die FNAB nur Aussagen über das relative Verhältnis einzelner Zellpopulationen zueinander (53).

* Ethicon GmbH, Hamburg, BR Deutschland

Während der Versuche wurden in regelmäßigen Abständen Proben aus der Milz entnommen. Hierfür wurden aus einem Reagenzröhrchen, welches 3 ml Na-EDTA-haltige Hank'sche Lösung ohne Calcium enthielt, 1 ml auf eine Spritze gezogen. Dann wurde die unter der Haut gut palpable Milz mit einer Hand fixiert und mit einer Spinalkanüle* an einem der beiden Pole punktiert, um den Hilus zu schonen. Nach Entfernung des Mandrins wurde die zuvor präparierte Spritze aufgesetzt und unter kreisenden Bewegungen Milzzellen aspiriert. Die gewonnenen Zellen, ca. 1×10^7 an der Zahl, wurden in das Reagenzröhrchen gegeben, wo kleine Gewebstückchen sich als Sediment zu Boden setzten. Die überstehende Einzelzellsuspension wurde anschließend abpipettiert und weiter aufgearbeitet.

3. Morphologische Zelldifferenzierung

Von der nach FNAB erhaltenen Einzelzellsuspension wurden 100 μ l entnommen und mit einer Zytocentrifuge** auf Objektträger ausgebreitet, um dann nach Pappenheim gefärbt zu werden (76). Anschließend wurde das Präparat unter einem Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung untersucht. Vom Rand ausgehend wurden in Mäanderbahnen 100 Zellen ausgezählt und in folgende Gruppen eingeteilt:

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------|
| a. Lymphozyten | e. Basophile Granulozyten |
| b. Plasmazellen | f. Monozyten |
| c. Neutrophile Granulozyten | g. Erythropoetische Vorstufen |
| d. Eosinophile Granulozyten | h. Undifferenzierte Blasten |

* 90-7, 226 3 1/2, Becton-Dickinson Inc., Mountainview, USA

** Cytocentrifuge 2, Shandon, Southern Products Ltd., Astmoore, Runcorn, UK

Hinzuzufügen ist, daß in jeder Gruppe nicht nur die reifen Formen, sondern auch Vorläuferzellen gezählt wurden mit Ausnahme undifferenzierter Blasten, die durch Pappenheimfärbung keiner Zellinie eindeutig zugeordnet werden konnten. Die später in den Diagrammen erscheinenden Zahlen verstehen sich als Prozentanteile von hundert ausgezählten Zellen.

4. Immunfluoreszenz

a. Allgemeines

Daß bestimmte Zellen mit einer definierten Funktion gemeinsam identische Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde bereits in B.I.3. erläutert. Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, welche mit hoher Sensitivität und Spezifität erlaubt, solche Zellen von anderen, die das entsprechende Antigen nicht besitzen, zu unterscheiden (80). Ein mit einem Fluorophor (in den vorliegenden Experimenten Fluoreszeinisothiocyanat, kurz FITC) gekoppelter Antikörper bindet sich fest an Antigenstrukturen der zu markierenden Zelle, der überschüssige, ungebundene Anteil wird ausgewaschen. FITC besitzt ein Absorptionsmaximum bei Licht einer Wellenlänge von 490-495 nm und emittiert seine charakteristische, grüne Farbe bei 517 nm. Wenn nun die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ultraviolettem Licht geeigneter Wellenlänge ausgesetzt werden, so besitzen markierte Zellen, an deren Oberfläche FITC-gekoppelte Antikörper haften, einen hellgrünen Saum, der sie von nicht markierten deutlich abhebt.

Man unterscheidet zwei Formen der Immunfluoreszenz, die direkte und die indirekte. Beide wurden in den vorliegenden Versuchen angewandt.

b. Direkte Immunfluoreszenz

Bei der direkten Immunfluoreszenz ist bereits der erste Antikörper mit einer fluoreszierenden Substanz gekoppelt (s. Abb. 2), im vorliegenden Fall FITC-konjugiertes Anti-Maus-Gammaglobulin zur Markierung der B-Lymphozyten.



Abb. 2 Direkte Immunfluoreszenz

Nach Entnahme der Probe für die Pappenheimfärbung wurden die Röhrchen mit Hank'scher Lösung aufgefüllt und 5 min. lang bei 275 g zentrifugiert. Die verbleibenden Zellen wurden, nachdem der Überstand mit einer Pipette abgesaugt war, 30 min. lang bei 20°C mit 50 µl des im Verhältnis 1:10 verdünnten Anti-Maus-Gammaglobulins inkubiert und dann erneut mit Hank'scher Lösung bei 275 g 5 min. lang gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Da bei der späteren Zählung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop die Erythrozyten, welche sich zu diesem Zeitpunkt noch immer intakt in der Suspension befanden, enorm gestört hätten, erfolgte als letzter Schritt deren Lyse mit 1 ml destilliertem Wasser. Nach 30 sec. wurde die Isotonie durch 1 ml 1,8% NaCl Lösung wiederhergestellt. Nach erneuter Waschung konnten die Zellen jetzt unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

c. Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz (s. Abb. 3) ist der erste gegen das Antigen gerichtete Antikörper nicht fluorophorgekoppelt, deshalb muß ein zweiter, fluoreszierender Antikörper an den ersten gebunden werden.

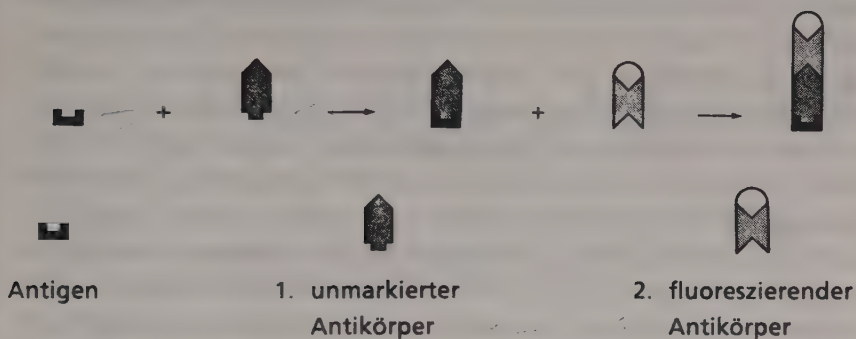


Abb. 3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz fand bei den Rattenversuchen Verwendung. Als erster Antikörper diente einer der monoklonalen Antikörper aus Tabelle 1, als zweiter das FITC-konjugierte Anti-Maus-Gammaglobulin (s. B.I.3.a.). Nachdem wiederum 100 μ l für die Pappenheimfärbung abpipettiert waren, wurde der Rest der Suspension auf so viele Reagenzröhrchen verteilt, wie verschiedene Antikörper zur Anwendung kamen, maximal drei. Nach einmaliger Waschung erfolgte die 30minütige Inkubation mit 50 μ l des ersten, im Verhältnis 1:50 verdünnten Antikörpers. Nach erneuter Waschung wurden die Zellen 30 min. lang mit dem zweiten, im Verhältnis 1:10 verdünnten Antikörper bei 20°C inkubiert. Zuletzt erfolgte wie bei der direkten Immunfluoreszenz die Lyse der Erythrozyten mit destilliertem Wasser.

d. Auswertung

Zur Auswertung im Durchlicht bei 400facher Vergrößerung diente ein Zeiss-Universal-Fluoreszenzmikroskop mit einem Neofluarobjektiv*. Fluoreszierende Zellen waren im Dunkelfeld von einem hellgrünen Saum umgeben, nicht fluoreszierendes Material erschien dunkelrot auf schwarzem Grund. Durch Auszählen von einhundert Zellen erhielt man den prozentualen Anteil der positiven, markierten Zellen an der Gesamtpopulation. Diese Gesamtpopulation unterlag in ihrer Zusammensetzung während der Versuche jedoch beträchtlichen Veränderungen. Da die Konzentration der Lymphozyten über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten - wie sonst üblich - wegen der zu geringen Materialmengen nach FNAB nicht möglich war, mußten die Erythrozyten mit destilliertem Wasser lysiert werden. Andere Zellen, vor allem Granulozyten und erythropoetische Vorstufen, konnten so aber aus der abzulesenden Suspension nicht eliminiert werden und nahmen Anteile zwischen 10% und 90% ein. Da jedoch das Verhältnis einer Lymphozytensubpopulation zur *Lymphozytengesamtpopulation* und nicht zur Gesamtheit aller Zellen ermittelt werden sollte, wurde ein Umrechnungsverfahren angewandt.

Bei den Rattenversuchen wurde die Summe der Lymphozytensubpopulation ($a_1 + a_2 + a_3 = \text{Ox 6/HL} + \text{W 3/25} + \text{Ox 8}$) der Lymphozytengesamtpopulation (a_{ges}) gleichgesetzt und anschliessend der prozentuale Anteil einer Subpopulation (a') an der Gesamtpopulation nach folgender Formel errechnet:

$$a' \% = \frac{a}{a_{\text{ges}}} \times 100 \% = \frac{a}{a_1 + a_2 + a_3} \times 100 \%$$

* Zeiss, Oberkochen, BR Deutschland

Beispiel:

Ox 6/HL = $a_1 = 15\%$, W 3/25 = $a_2 = 25\%$, Ox 8 = $a_3 = 15\%$

Dann ist der prozentuale Anteil der Ox 6/HL Subpopulation (a_1') an der Lymphozytengesamtpopulation (a_{ges}):

$$a_1' = \frac{a}{a_{\text{ges}}} \times 100\% = \frac{a}{a_1 + a_2 + a_3} \times 100\% =$$
$$\frac{15\%}{15\% + 25\% + 15\%} \times 100\% = 30\%$$

30% beträgt nun der prozentuale Anteil der Ox 6/HL-positiven Zellen an der Lymphozytengesamtpopulation. Die übrigen Subpopulationen lassen sich auf dieselbe Weise errechnen, und deren Werte wurden auch in dieser Form in die Diagramme aufgenommen.

Bei den Versuchen mit nackten Mäusen unter Verwendung nur eines Antikörpers war dieses Verfahren nicht möglich. Die ausgezählten Prozentzahlen der fluoreszierenden Zellen wurden als Ig + Zellen (entsprechend B-Lymphozyten) unverändert in die Diagramme übertragen. Um den Prozentanteil der B-Lymphozyten an allen Lymphozyten zu ermitteln, wurde die Prozentzahl der Ig + Zellen aus der Immunfluoreszenz durch die Prozentzahl der in den nach Pappenheim gefärbten Präparaten ausgezählten Lymphozyten dividiert und mit 100% multipliziert. Die errechnete Zahl (Ig + / Lymphozyten x 100%) entspricht dem prozentualen Anteil der B-Lymphozyten an allen Lymphozyten.

5. Statistische Berechnung

Da bei einer Prüfung der Werte ein beträchtlicher Teil nicht den Kriterien der Normalverteilung entsprach, sind in allen Diagrammen Mediane angegeben. Die Bedeutung der Balkendiagramme erklärt sich aus Abb. 4.

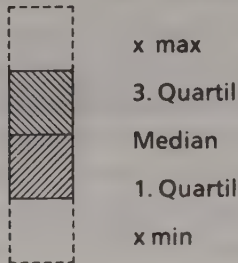


Abb. 4

Für die statistische Prüfung der Ergebnisse auf Signifikanz wurde in allen Fällen der Wilcoxon Test angewandt (90).

C. VERSUCHSBESCHREIBUNGEN UND ERGEBNISSE

I. TUMORWACHSTUM BEI LONG EVANS RATTEN OHNE KRYO-THERAPIE

1. Versuchsaufbau

10 Long Evans Ratten wurden 1×10^7 Walker 256 Karzinosarkomzellen in die rechte Flanke subkutan injiziert. Feinnadelaspirationsbiopsien der Milz wurden vor Tumorinokulation (Tag 0), am Tag darauf und dann während des Tumorwachstums in zweitägigen Abständen entnommen. Die Zellen wurden mit Hilfe der Pappenheimfärbung und Immunfluoreszenz differenziert. Die Ergebnisse setzen sich aus zwei zeitlich hintereinander angesetzten Versuchsgruppen zu je 5 Tieren zusammen. Die Immunfluoreszenz mußte getrennt ausgewertet werden, da beim ersten Versuch nur der Anti-T-gesamt-Antikörper zur Verfügung stand, nicht jedoch W 3/25 und Ox 8, welche beim zweiten Versuch den Anti-T-gesamt-Antikörper ersetzen.

2. Ergebnisse

Der Tumor ging bei allen 10 Tieren an und tötete bis zum 14. Versuchstag acht Tiere, die übrigen zwei bis zum 16. Versuchstag.

Die Pappenheimfärbung zeigt, daß in erster Linie Lymphozyten, neutrophile Granulozyten sowie erythropoetische Vorstufen durch das Tumorwachstum beeinflußt werden. Der Anteil der Lymphozyten, der vor Tumorinokulation bei 90% liegt, sinkt bis Tag 15 auf seinen Tiefstand von 21,5% (Abb. 5). Erythropoetische Vorstufen, welche in der normalen Rattenmilz fast nicht auf-

treten (0% an Tag 0), finden sich ab dem 7. Versuchstag in vermehrtem Maße und erreichen ihren Höchstwert an Tag 15 mit 48,5% (Abb. 7).

Auch die Granulopoese wird unter Tumorwachstum aktiviert. Die neutrophilen Granulozyten nehmen vom Tag der Tumorinokulation an (Tag 0: 7%) stetig zu bis auf 44% an Tag 11, um dann jedoch durch die Erythropoese verdrängt zu werden, die im Finalstadium in den Vordergrund tritt (Abb. 6).

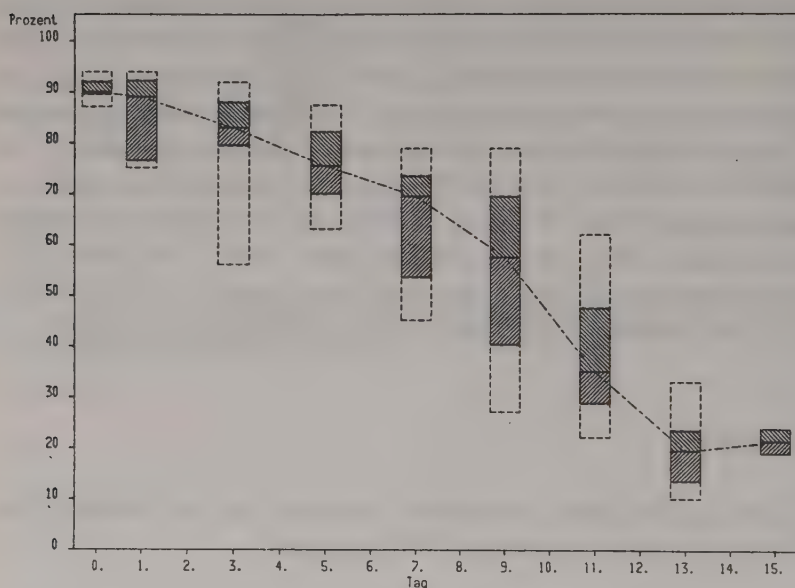


Abb. 5 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
Abnahme der Lymphozyten in der Milz in % Gesamtzellen
Tumorinokulation an Tag 0 (n = 10)

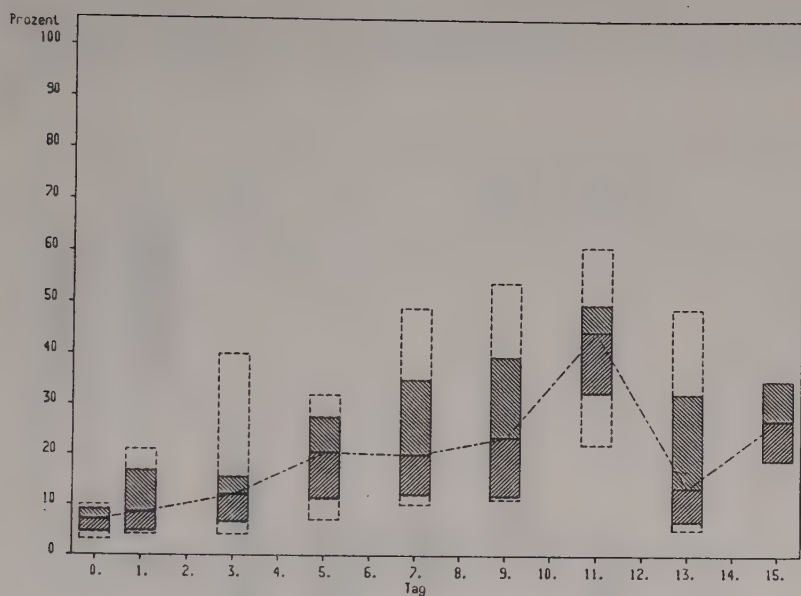


Abb. 6 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
 Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumoringokulation an Tag 0 (n = 10)

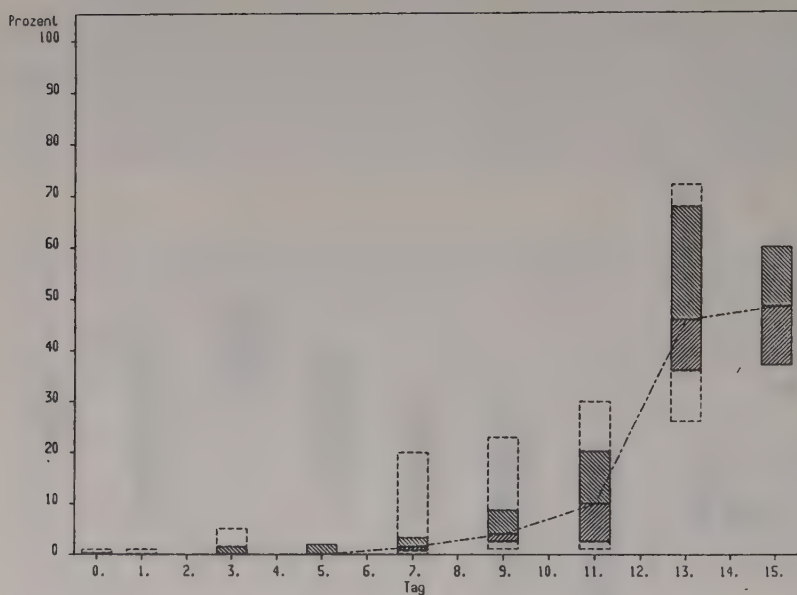


Abb. 7 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
 Anstieg der erythropoetischen Vorstufen in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumorinokulation an Tag 0 (n = 10)

In der Immunfluoreszenz beobachtet man während des Versuchs mit den beiden Antikörpern Ox 6/HL (B-Lymphozyten) und Anti-T-gesamt (T-Lymphozyten) eine Verarmung der Milz an B-Zellen (Tag 0: 44%, Tag 15: 13,5%, Abb. 8), der eine Anreicherung an T-Zellen entspricht (Tag 0: 56%, Tag 15: 86,5%, Abb. 9).

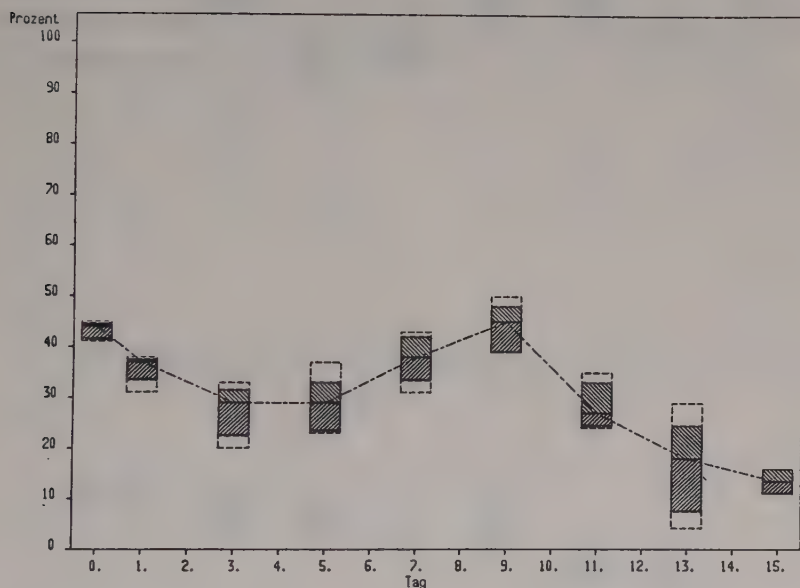


Abb. 8 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
 Abnahme der B-Lymphozyten (Ox 6/HL) in der Milz in % Lymphozytengesamtpopulation
 Tumordinokulation an Tag 0 (n = 5)

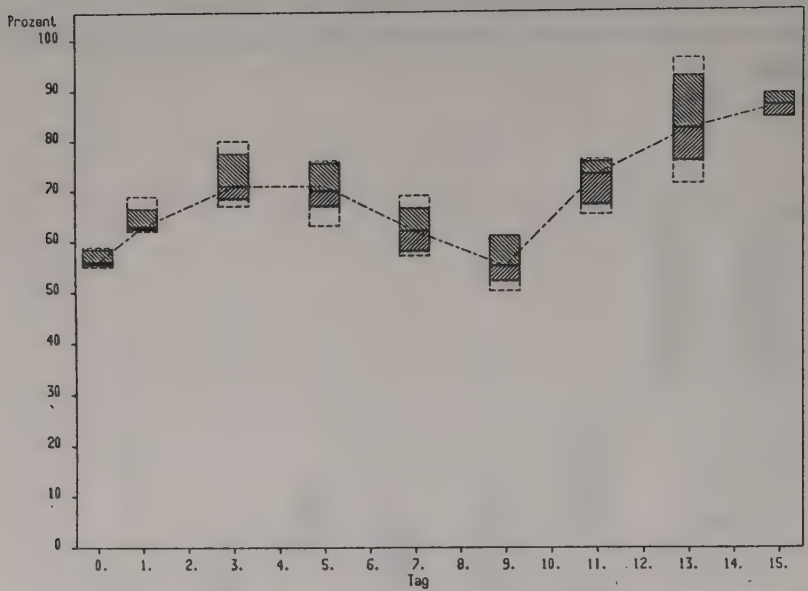


Abb. 9 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
 Anstieg der T-Lymphozyten (Anti-T-gesamt) in der Milz in
 % Lymphozytengesamtpopulation
 Tumordinokulation an Tag 0 (n = 5)

Im zweiten Versuch mit drei Antikörpern bestätigen sich diese Aussagen, doch kann jetzt die T-Zell-Population in Helfer- und zytotoxische/Suppressor-Lymphozyten unterschieden werden. Wieder fallen die B-Zellen ab (Tag 0: 28%, Tag 13: 10%, Abb. 10), während Helferlymphozyten (Tag 0: 45%, Tag 13: 49%, Abb. 11) und zytotoxische/Suppressorlymphozyten (Tag 0: 32%, Tag 13: 38%, Abb. 12) ansteigen.

Daß die Ausgangswerte der Ox 6/HL-positiven Zellen sich in den beiden Versuchen unterscheiden, liegt am in Abschnitt B.II.4.d. erläuterten Umrechnungsverfahren, in dem sich die Tatsache niederschlägt, daß W 3/25 und Ox 8 zusammen mehr Zellen markieren als Anti-T-gesamt alleine.

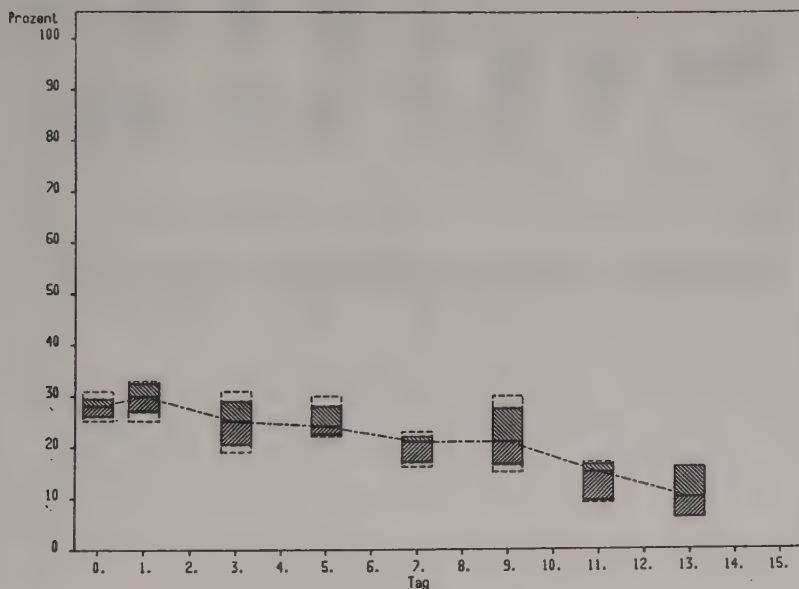


Abb. 10 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
Abnahme der B-Lymphozyten (Ox6/HL) in der Milz in
% Lymphozytengesamtpopulation
Tumordinokulation an Tag 0 (n = 5)

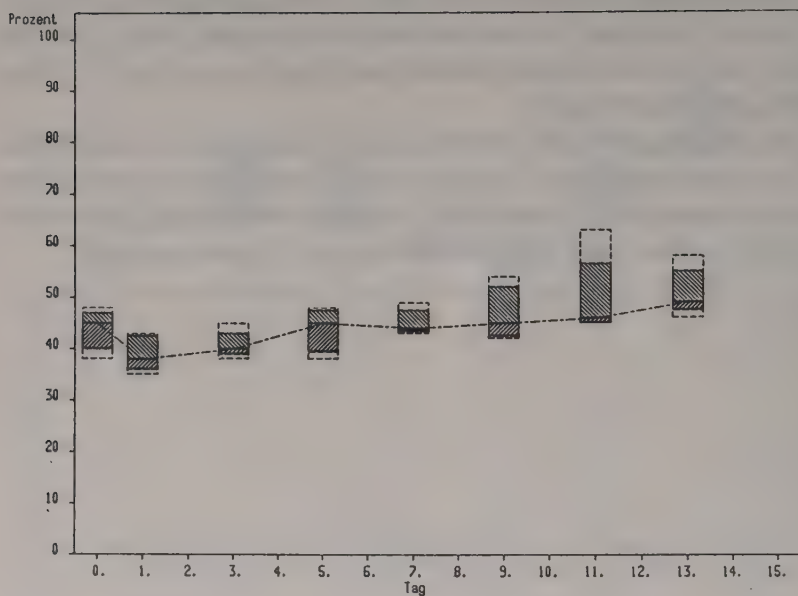


Abb. 11 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
 Anstieg der T-Helferlymphozyten (W 3/25) in der Milz in
 % Lymphozytengesamtpopulation
 Tumorinokulation an Tag 0 (n = 5)

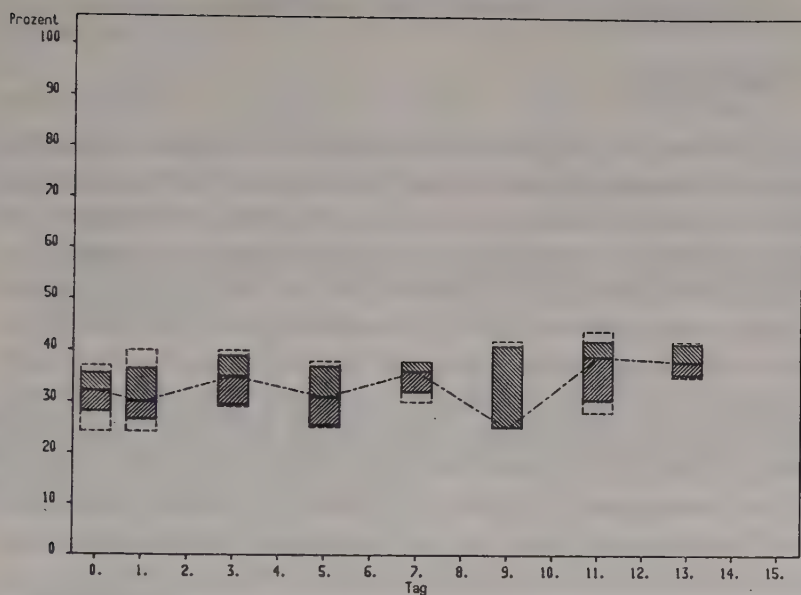


Abb. 12 Tumorwachstum bei L.E. Ratten ohne Kryotherapie
 Anstieg der T-zytotoxischen/Suppressorlymphozyten (Ox 8) in der
 Milz in % Lymphozytengesamtpopulation
 Tumorinokulation an Tag 0 (n = 5)

II. KRYOTHERAPIE VON TUMOREN BZW. HAUT BEI LONG EVANS RATTEN

1. Versuchsgruppe tumortragender Long Evans Ratten

a. Versuchsaufbau

Am Tag 0 wurden 19 Long Evans Ratten jeweils 1×10^7 Walker 256 Karzinosarkomzellen unter die Haut der rechten Flanke injiziert. Nachdem die Tumoren am Tag 4 eine Größe von ca. 1 cm im Durchmesser erreicht hatten, erfolgte die einmalige Kryotherapie. Um optimalen Kontakt zu schaffen zwischen der Sonde des Kryochirurgiesystems und der Haut der Tiere, wurden die Ratten am vorgesehenen Ort der Kälteapplikation rasiert, und die letzten Haarreste mit Enthaarungscreme beseitigt. Die Tumoren wurden dann durch die intakte, nicht inzidierte Haut hindurch bei -160°C 3 Minuten lang vereist. Erleichtert wird die Vereisung durch den Umstand, daß die Kryosonde währenddessen stark an der Haut der Tiere haftet, und sich der Tumor dadurch leicht vom unterliegenden Gewebe abheben läßt. So kann man beobachten, wie die Vereisungszone sicher über die Tumorgrenzen hinwegschreitet, was nach drei Minuten durchwegs der Fall war. Nach Kryotherapie tauten die Tumoren innerhalb von ca. 15 Minuten ohne weitere Maßnahmen spontan auf. Sämtliche Eingriffe an den Ratten wurden unter Äthernästhesie durchgeführt. Feinnadelaspirationsbiopsien der Milz wurden in zwei- bis dreitägigen Abständen bis zum 27. Tag nach Tumorinokulation entnommen.

b. Ergebnisse

Von 19 Tieren, deren Tumoren kryotherapiert wurden, zeigten 13 Tiere Totalremission der Geschwülste und lebten ohne Anzeichen eines Rezidivs nach 3 Monaten immer noch, während der Tumor bei 6 Tieren trotz Kryotherapie weiterwuchs und bis Tag 20 sämtliche Ratten tötete (Tab. 2).

Gesamtzahl der kryotherapierten Ratten	19	Überlebenszeit
Tumorremission	13	> 90 Tage
Tumorrezidiv	6	< 20 Tage

Tab. 2 Heilungserfolg nach Kryotherapie eines Walker 256 Karzinosarkoms bei L.E. Ratten

Da sich die Immunantworten der Tiere mit Totalremission beträchtlich von dem der Tiere mit Tumorrezidiven unterschieden, wurden die Ergebnisse der beiden Gruppen getrennt ausgewertet.

a. Totalremission

Unter Totalremission nach Kryochirurgie treten in der Milz keine Veränderungen der morphologisch differenzierbaren Zellpopulationen auf, wie sie unter Tumorwachstum beobachtet werden. Lymphozyten, Granulozyten und erythropoetische Vorstufen bleiben unverändert auf ihrem Ausgangsniveau (Abb. 13, 14, 15).

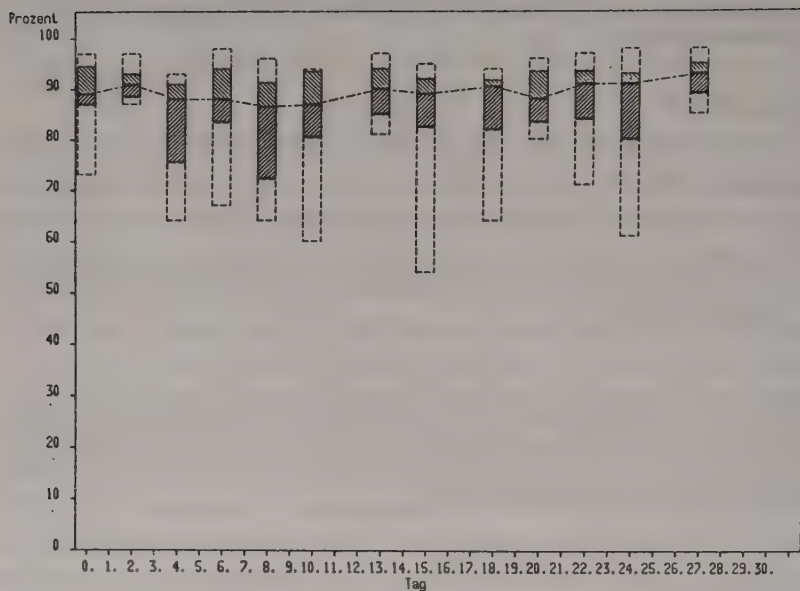


Abb. 13 Totalremission nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
Verlauf der Lymphozyten in der Milz in % Gesamtzellen
Tumordinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 13)

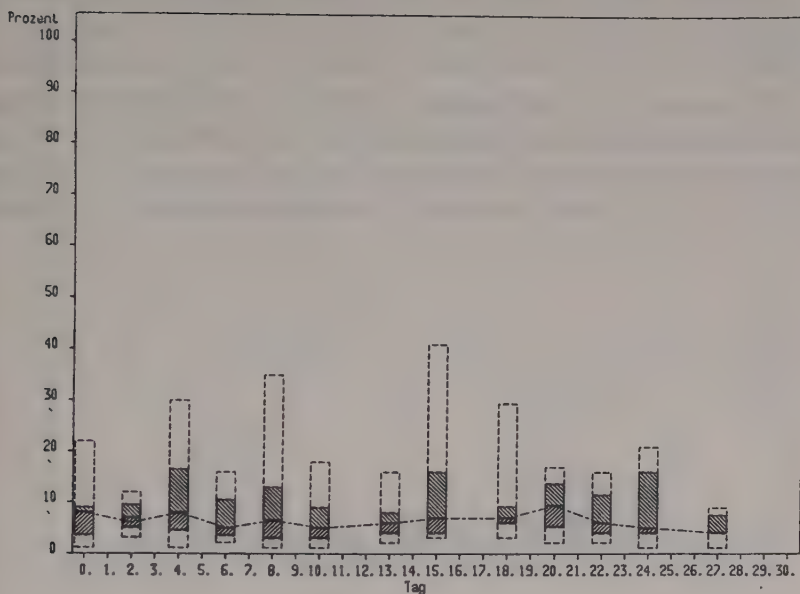


Abb. 14 Totalremission nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Verlauf der neutrophilen Granulozyten in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumordinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 13)

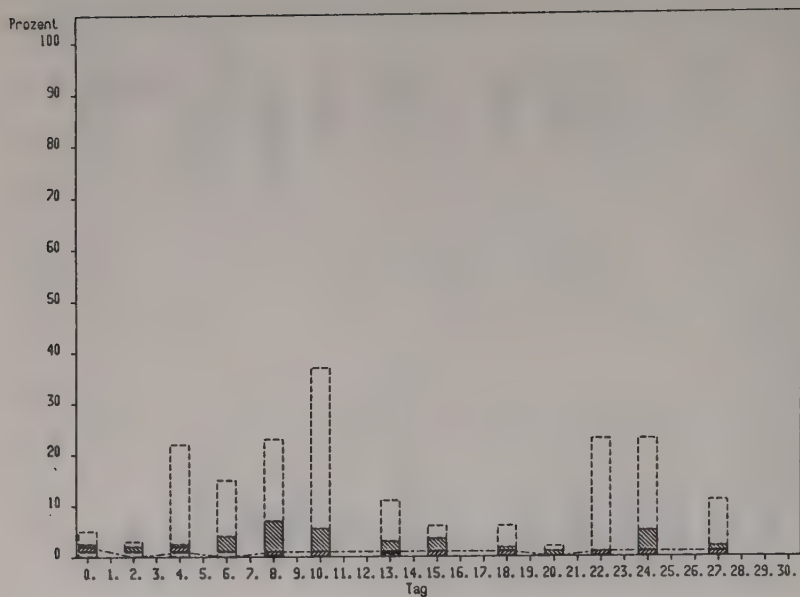


Abb. 15 Totalremission nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Verlauf der erythropoetischen Vorstufen in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 13)

Dagegen kommt es zwischen dem 6. und 10. Versuchstag, also 2 - 6 Tage nach Kryotherapie, zu Verschiebungen in den Zahlen der Lymphozytensubpopulationen. Die zytotoxischen/Suppressorzellen steigen von 30% an Tag 4 auf 41% an Tag 8 an, um bis Tag 13 mit 33% wieder in die Nähe des Ausgangswertes zurückzukehren (Abb. 18). Diesem Anstieg steht ein Abfall der Helferzellen von 41% (Tag 4) auf 33% (Tag 8) entgegen (Abb. 17), während die B-Zell-Zahlen sich mit 28% (Tag 4) und 25% (Tag 8) nur wenig verändern (Abb. 15). Bis zum 13. Versuchstag kehren die Werte aller Lymphozytensubpopulationen wieder auf ihre Ausgangshöhe vor Kryotherapie zurück.

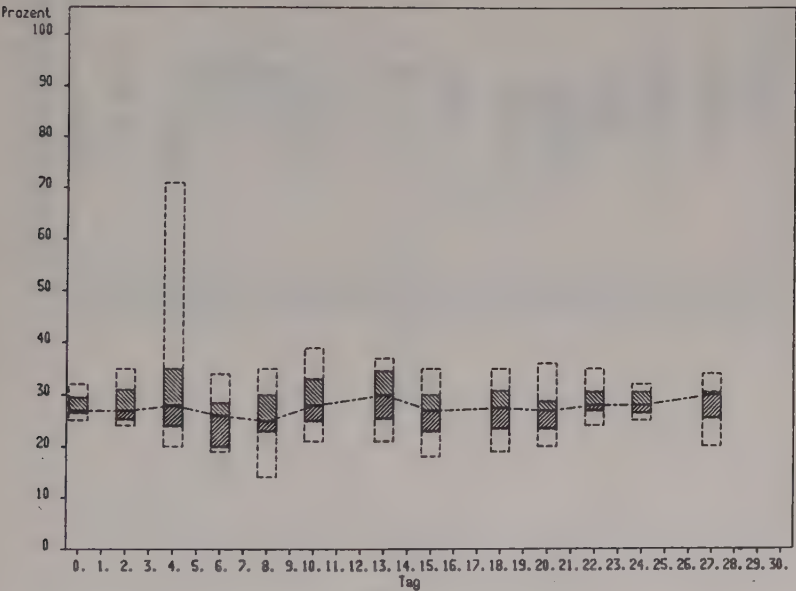


Abb. 16 Totalremission nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Verlauf der B-Lymphozyten (Ox 6/HL) in der Milz in % Lymphozyten-
 gesamtpopulation
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 13)

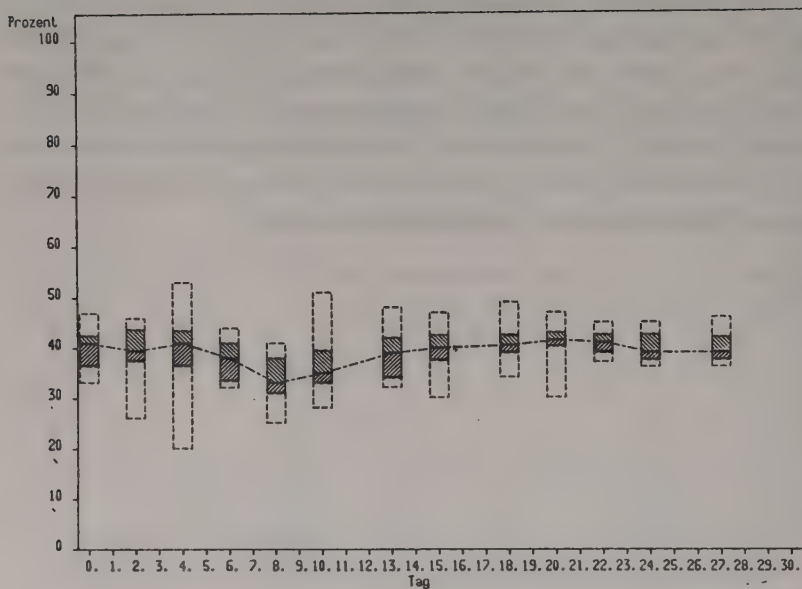


Abb. 17 Totalremission nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
Verlauf der T-Helferlymphozyten (W 3/25) in der Milz in % Lympho-
zytengesamtpopulation
Tumordinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 13)

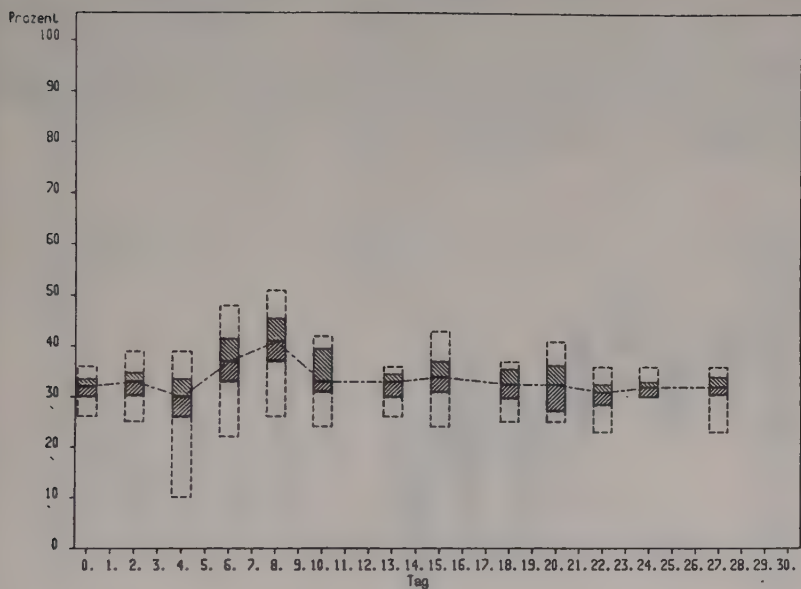


Abb. 18 Totalremission nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Verlauf der T-zytotoxischen/Suppressorlymphozyten (Ox 8) in der
 Milz in % Lymphozytengesamtpopulation
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 13)

β. Tumorrezidiv

Ergebnisse von Tieren, deren Tumoren nach Kryotherapie rezidierten, ähneln in ihrem Verhalten denen des ersten Versuchs unter Tumorwachstum ohne Kryotherapie. Bei ihnen fallen die Lymphozyten ab (Tag 0: 88%, Tag 18: 12,5%), die neutrophilen Granulozyten steigen an (Tag 0: 7,5%, Tag 15: 22%), die Erythropoese wird aktiviert (Tag 0: 3%, Tag 18: 69,5%) (Abb. 19, 20, 21).

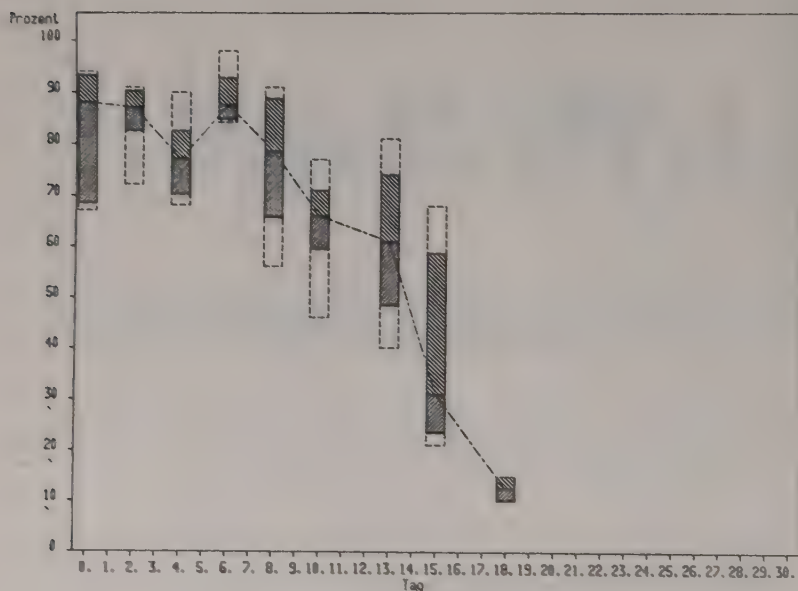


Abb. 19 Tumorrezidiv nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
Abnahme der Lymphozyten in der Milz in % Gesamtzellen
Tumoringokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 6)

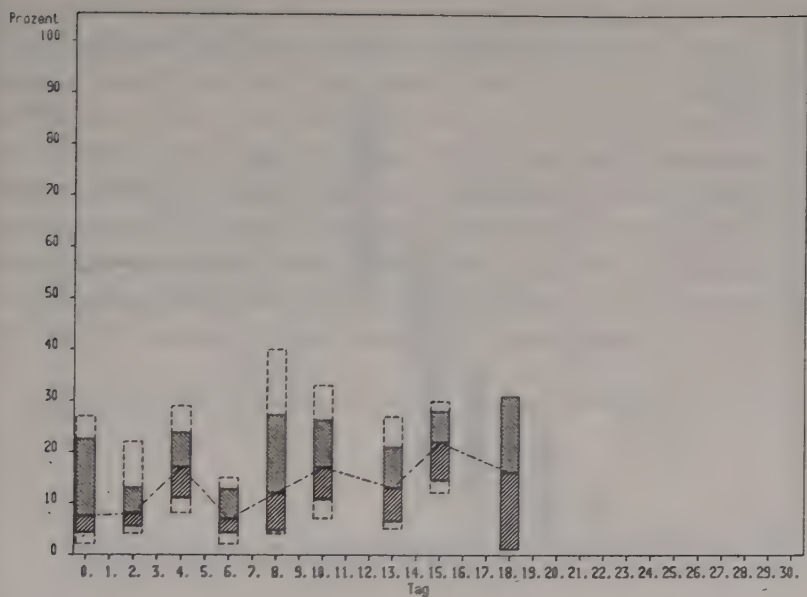


Abb. 20 Tumorrezidiv nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 6)

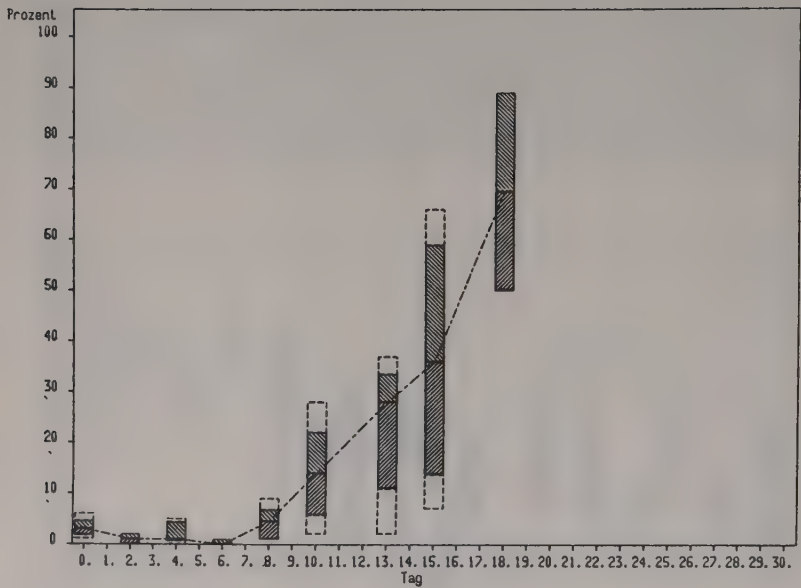


Abb. 21 Tumorrezidiv nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Anstieg der erythropoetischen Vorstufen in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 6)

Die Zahlen der in der Immunfluoreszenz ausgewerteten Zellen gleichen zunächst denen von Ratten, die den Tumor nach Kryotherapie abstoßen. Der Anteil der zytotoxischen/Suppressorlymphozyten wächst von 31% (Tag 4) auf 39% (Tag 8) (Abb. 24), derjenige der B-Lymphozyten sinkt von 32% am Tag der Vereisung auf 25,5% vier Tage später (Abb. 22). Die Helferlymphozyten nehmen von 35,5% an Tag 4 auf 32,5% an Tag 6 (Abb. 23) ab, um dann aber bis zum Tod der Tiere einen Wert von 50,5% (Tag 18) zu erreichen. Dieser Zunahme steht der weitere Abfall der B-Lymphozyten auf 21,5% an Tag 18 gegenüber (Abb. 22). Beide Tendenzen lassen sich auch in der Versuchsgruppe tumortragender Ratten ohne Kryotherapie beobachten. Die Subpopulation der zytotoxischen/Suppressorlymphozyten kehrt bis zum 13. Versuchstag mit 31% ungefähr wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. 24).

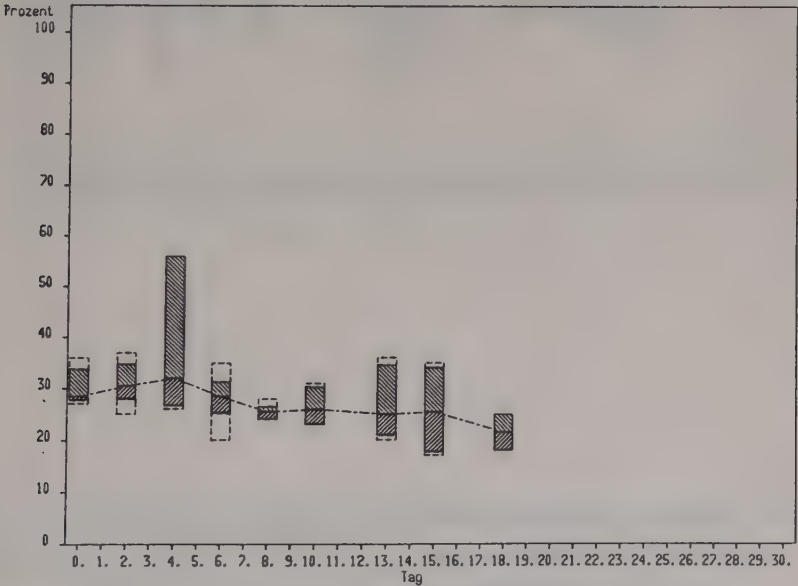


Abb. 22 Tumorrezidiv nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
 Verlauf der B-Lymphozyten (Ox 6/HL) in der Milz in % Lymphozyten-
 gesamtpopulation
 Tumorerinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 6)

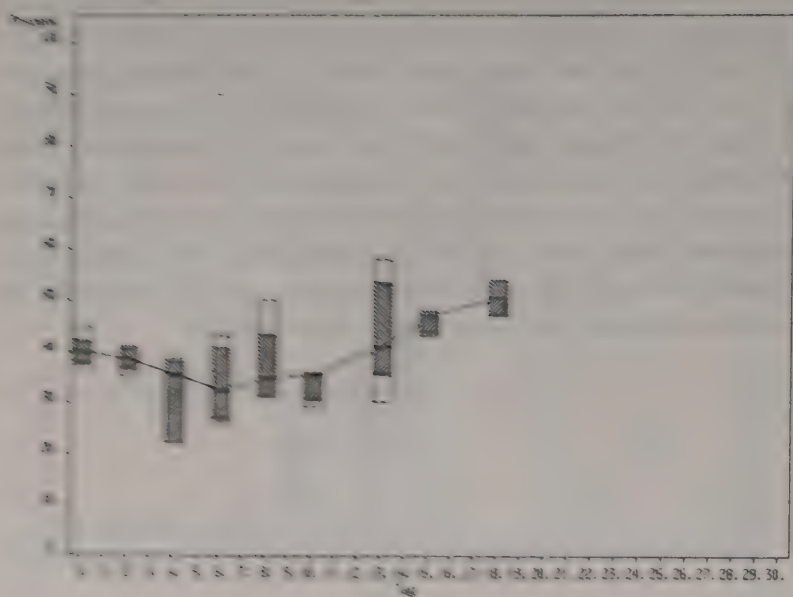


Abb. 23 Tumormengen nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
Veränderung der T-lymphozyten (W 3,25) in der Milz in % Lympho-
zytenpopulation
Tumormengen vor Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 6)

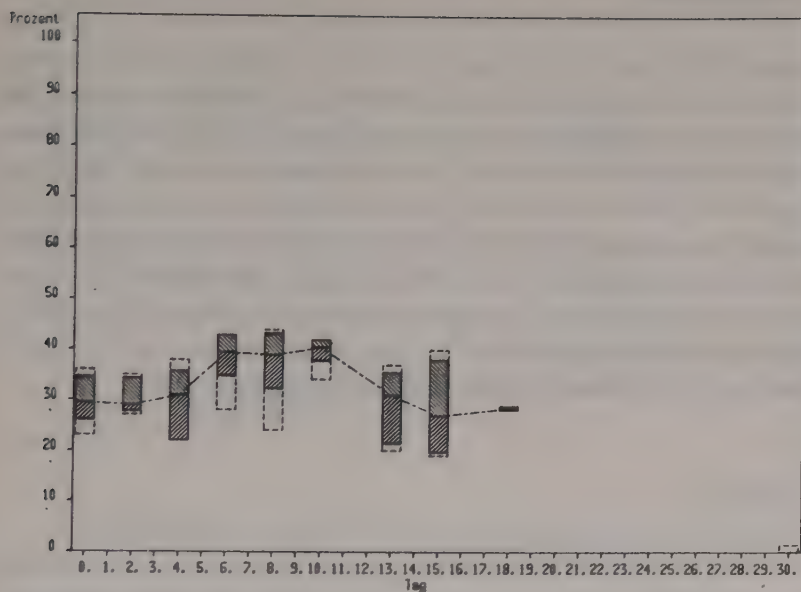


Abb. 24 Tumorrezidiv nach Kryotherapie tumortragender L.E. Ratten
Verlauf der T-zytotoxischen/Suppressorlymphozyten (Ox 8) in der
Milz in % Lymphozytengesamtpopulation
Tumordinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 4 (n = 6)

2. Kontrollgruppe tumorfreier Long Evans Ratten

a. Versuchsaufbau

Um auszuschließen, daß die Fluktuationen der Lymphozytensubpopulationen Vorgänge darstellen, die unabhängig vom Vorliegen eines Tumors immer nach kryochirurgischer Behandlung von Gewebe auftreten, wurde Hautgewebe von 10 Ratten vereist, denen zuvor kein Tumor inokuliert worden war. Als Ort der Kälteapplikation diente wie in der Versuchsgruppe die rechte Flanke. Das Hautgewebe wurde ebenfalls 3 Minuten lang bei -160°C vereist. Um die Werte der Kontrollgruppe denen der Versuchsgruppe gegenüberstellen zu können, wurde der Tag der kryochirurgischen Behandlung als Tag 4 definiert, und Feinnadelaspirationsbiopsien der Milz in der betreffenden Spanne bis zum Tag 13 zu denselben Zeitpunkten entnommen wie in der Versuchsgruppe.

b. Ergebnisse

Bei keiner der drei Lymphozytensubpopulationen kam es nach Hautvereisung zu Abweichungen, die sich von den Ausgangswerten um mehr als 3% unterschieden hätten (Abb. 25, 26, 27).

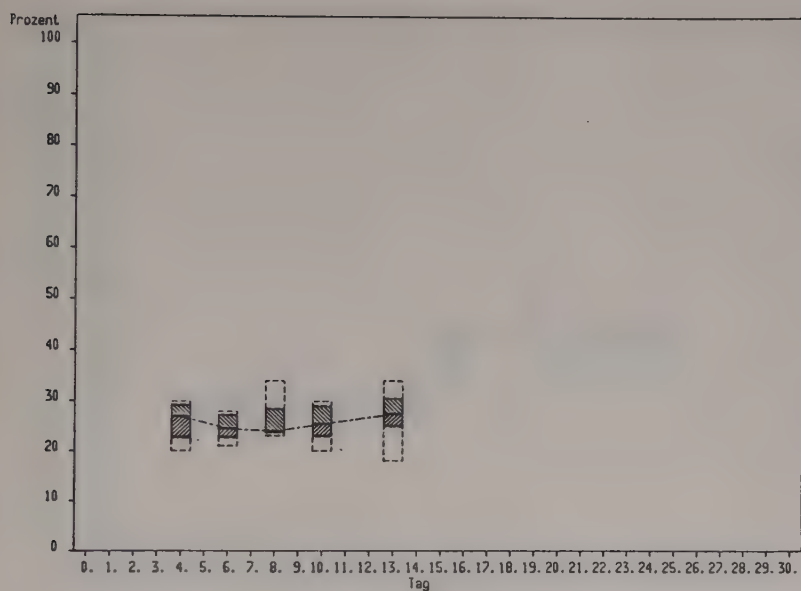


Abb. 25 Hautvereisung tumorfreier L.E. Ratten
 Verlauf der B-Lymphozyten (Ox 6/HL) in der Milz in % Lymphozyten-
 gesamtpopulation
 Hautvereisung an Tag 4 (n = 10)

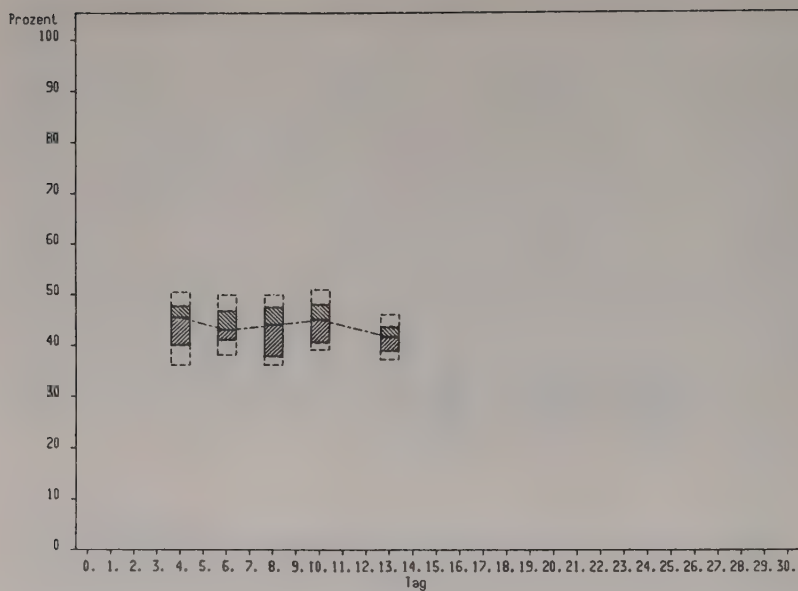


Abb. 26 Hautvereisung tumorfreier L.E. Ratten
 Verlauf der T-Helferlymphozyten (W 3/25) in der Milz in % Lymphozytengesamtpopulation
 Hautvereisung an Tag 4 (n = 10)

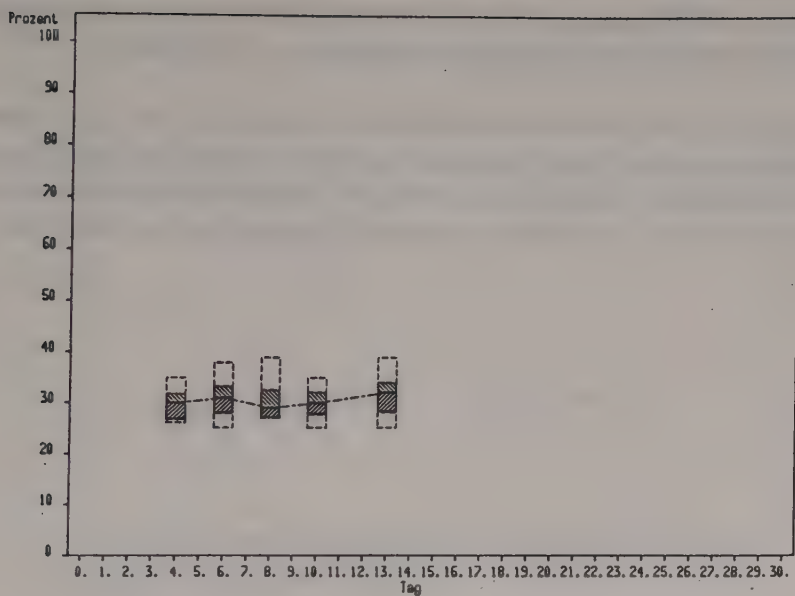


Abb. 27 Hautvereisung tumorfreier L.E. Ratten
 Verlauf der T-zytotoxischen/Suppressorlymphozyten (0×8)
 in der Milz in % Lymphozytengesamtpopulation
 Hautvereisung an Tag 4 ($n = 10$)

Um die Fluktuationen in der Versuchsgruppe nach Kryotherapie auf Signifikanz zu untersuchen, wurden die Differenzen zwischen den Werten nach Vereisung und den Ausgangszahlen der Versuchsgruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen und auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ geprüft.

Dabei zeigte sich, daß die Veränderungen bei B-Zellen (Abb. 28) und T-Helferlymphozyten (Abb. 29) die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ nicht unterschreiten konnten, während der Anstieg der zytotoxischen/Suppressorzellen mit $p = 0,0378$ an Tag 6 und $p = 0,0297$ an Tag 8 signifikant war (Abb. 30).

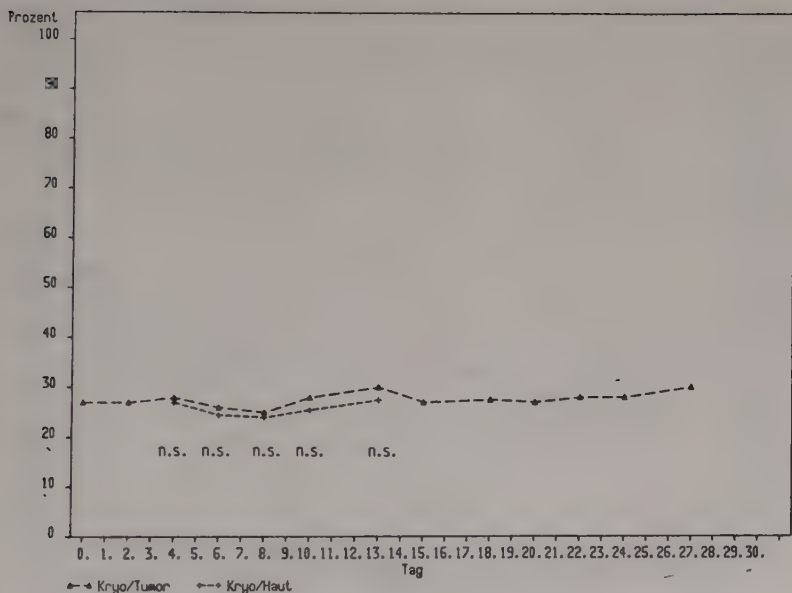


Abb. 28 Vergleich zwischen der Versuchsgruppe tumortragender L.E. Ratten mit Remission nach Kryotherapie (Kryo/Tumor) und der Kontrollgruppe tumorfreier L.E. Ratten mit Hautvereisung (Kryo/Haut)
Verlauf der B-Lymphozyten (Ox 6/HL) in der Milz in % Lymphozyten-gesamtpopulation

Vereisung an Tag 4 n.s. = nicht signifikant bei $p < 0,05$
Kryo/Tumor: n = 13 Kryo/Haut: n = 10

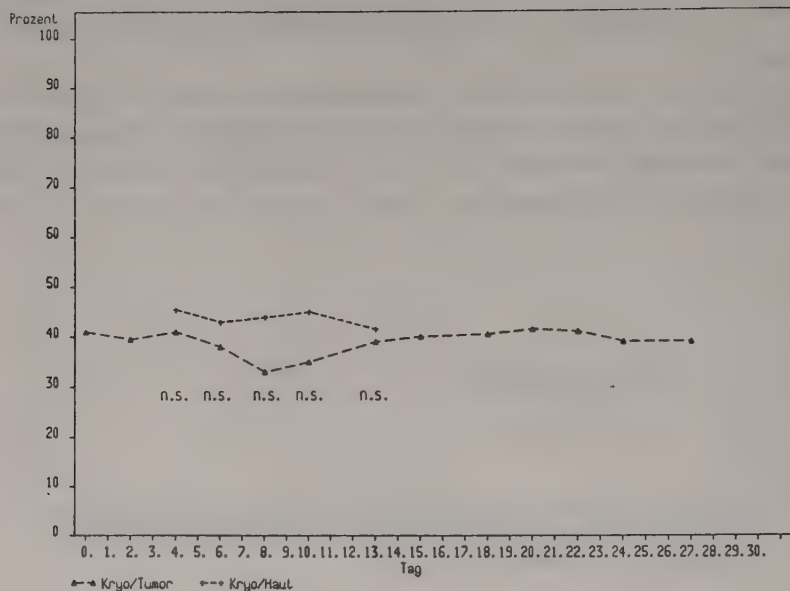


Abb. 29 Vergleich zwischen der Versuchsgruppe tumortragender L.E. Ratten mit Remission nach Kryotherapie (Kryo/Tumor) und der Kontrollgruppe tumorfreier L.E. Ratten mit Hautvereisung (Kryo/Haut) Verlauf der T-Helferlymphozyten (W 3/25) in der Milz in % Lymphozytengesamtpopulation

Vereisung an Tag 4 n.s. = nicht signifikant bei $p < 0,05$
 Kryo/Tumor: n = 13 Kryo/Haut: n = 10

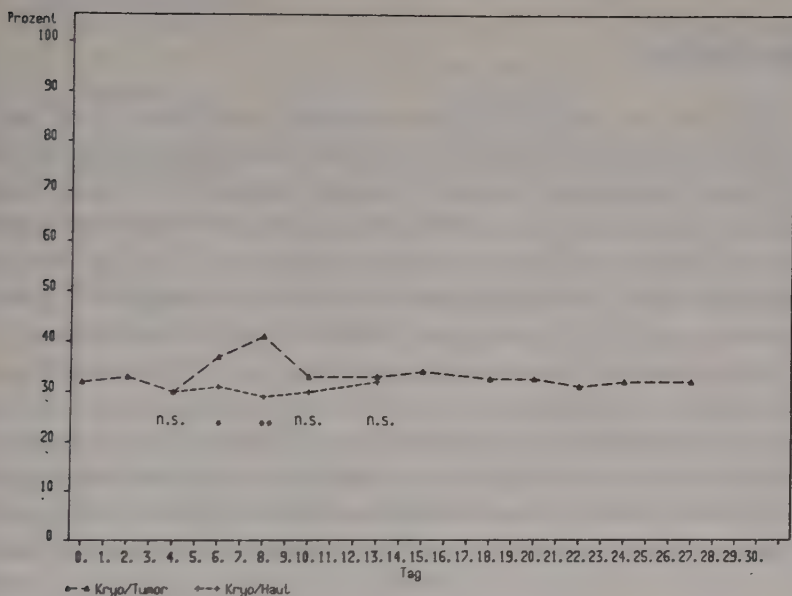


Abb. 30 Vergleich zwischen der Versuchsgruppe tumortragender L.E. Ratten mit Remission nach Kryotherapie (Kryo/Tumor) und der Kontrollgruppe tumorfreier L.E. Ratten mit Hautvereisung (Kryo/Haut) Verlauf der T-zytotoxischen/Suppressorlymphozyten (Ox 8) in der Milz in % Lymphozytengesamtpopulation

Vereisung an Tag 4

n.s. = nicht signifikant bei $p < 0,05$

* : signifikant bei $p = 0,0378$

** : signifikant bei $p = 0,0297$

Kryo/Tumor: $n = 13$

Kryo/Haut: $n = 10$

III. KRYOTHERAPIE VON TUMOREN BEI NU/NU NMRI MÄUSEN UND +/+ NMRI MÄUSEN (BEHAARTE MÄUSE)

1. Versuchsaufbau

Um zu ergründen, ob Tiere ohne funktionierendes T-Zell-System in der Lage sind, Tumoren nach Kryotherapie allein mit Hilfe ihrer möglichen humoralen Immunantwort abzuwehren, wurden 12 nackten Mäusen 1×10^7 Lewis Lung Karzinomzellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Am 7. Tag nach Tumorinokulation, als die Geschwülste einen Durchmesser von ca. 0,5 cm erreicht hatten, wurden sie 2 Minuten lang bei -160°C vereist. Der Eingriff erfolgte in Äthernästhesie durch die intakte, dem Tumor aufliegende Haut hindurch. Da durch Kryotherapie die Körpertemperatur der Mäuse auf Grund ihres geringen Gewichts stärker absinkt als bei den 10 - 15 mal schwereren Ratten, wurden sie während der Auftauphase 15 Minuten lang auf einer Wärmebank mit Infrarotlicht bestrahlt und dann erst in die Käfige zurückgegeben. Feinnadelaspirationsbiopsien der Milz wurden mit Rücksicht auf die Anfälligkeit nackter Mäuse jedweder Eingriffe gegenüber in drei- bis viertägigen Abständen entnommen.

Eine Kontrollgruppe von 10 behaarten (+ / +) NMRI Mäusen, deren Lewis Lung Tumoren unter denselben Bedingungen kryotherapiert wurden, sollte sicherstellen, daß das Lewis Lung Karzinom bei NMRI Mäusen mit intaktem Immunsystem unter Kryotherapie zur Remission gelangt.

2. Ergebnisse

Bei keiner einzigen der nu/nu NMRI Mäuse konnte durch Kryotherapie das Lewis Lung Karzinom zu einer dauerhaften Remission gebracht werden. Alle Tiere wurden innerhalb von 32 Tagen durch den rezidivierenden Tumor getötet, während alle 10 Tiere der behaarten Kontrollgruppe nach 60 Tagen ohne sicht- und tastbare Geschwulst noch am Leben waren (Tab. 3).

Gesamtzahl aller kryotherapierten Mäuse	22	Rezidiv	Überlebenszeit
nu/nu NMRI Mäuse	12	12 (100 %)	< 32 Tage
+ / + NMRI Mäuse	10	0 (100 %)	> 60 Tage

Tab. 3 Heilungserfolg nach Kryotherapie eines Lewis Lung Karzinoms bei nu/nu und + / + NMRI Mäusen

Trotz Kryotherapie fallen unter progredientem Wachstum des Tumorrezidivs bei nackten Mäusen die Lymphozyten von 68,5% vor Tumorinokulation auf 8% an Tag 30 ab (Abb. 31). Die Granulopoese wird hingegen aktiviert; neutrophile Granulozyten, deren Anteil an Tag 0 bei 7% lag, steigen bis Tag 30 auf 68% an (Abb. 32), während die Erythropoese durch das Tumorwachstum kaum beeinflusst wird (Abb. 33).

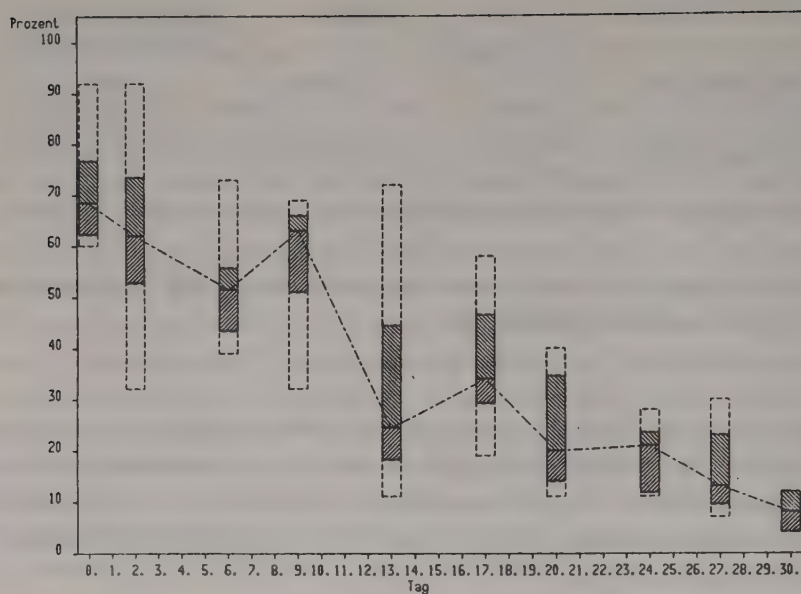


Abb. 31 Kryotherapie bei tumortragenden nu/nu NMRI Mäusen
 Abnahme der Lymphozyten in der Milz in % Gesamtzellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 7 (n = 12)

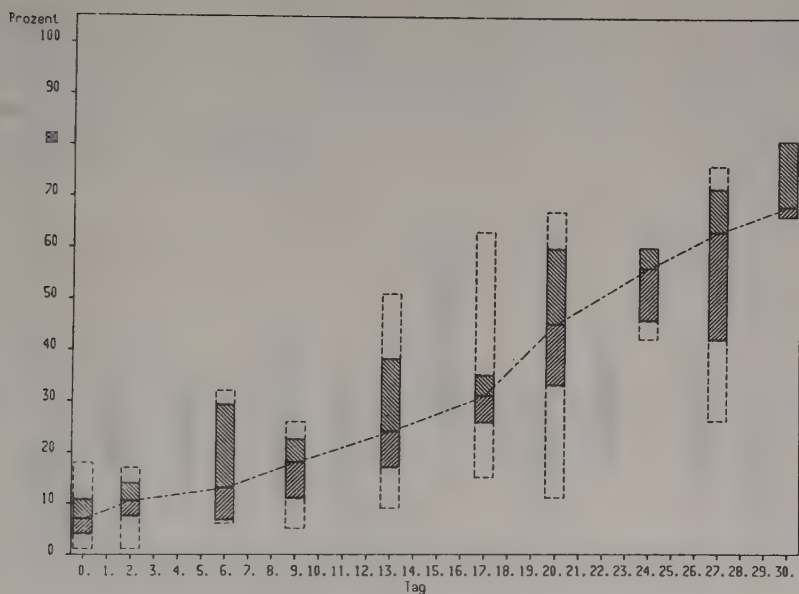


Abb. 32 Kryotherapie bei tumortragenden nu/nu NMRI Mäusen
 Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 7 (n = 12)

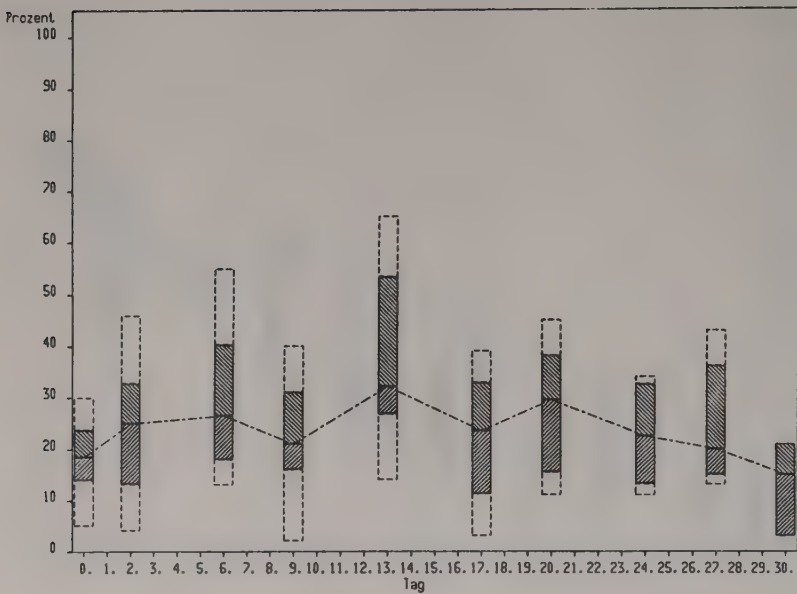


Abb. 33 Kryotherapie bei tumortragenden nu/nu NMRI Mäusen
 Anstieg der erythropoetischen Vorstufen in der Milz in % Gesamt-
 zellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 7 (n = 12)

Die B-Lymphozyten (Ig + Zellen) als Anteil an der Gesamtheit aller Milzzellen fallen von 49% an Tag 0 auf 1% an Tag 30 zurück (Abb. 34). Der Prozentsatz der B-Zellen an der Lymphozytenpopulation sinkt ebenfalls von 74% an Tag 0 auf 13% an Tag 30. Dies bedeutet, daß Lymphozyten die keine Immunglobuline auf ihrer Oberfläche tragen, also K-, NK- oder T-ähnliche Lymphozyten, im finalen Stadium 87% aller Lymphozyten ausmachen gegenüber nur 26% vor Tumorgabe (Abb. 35).

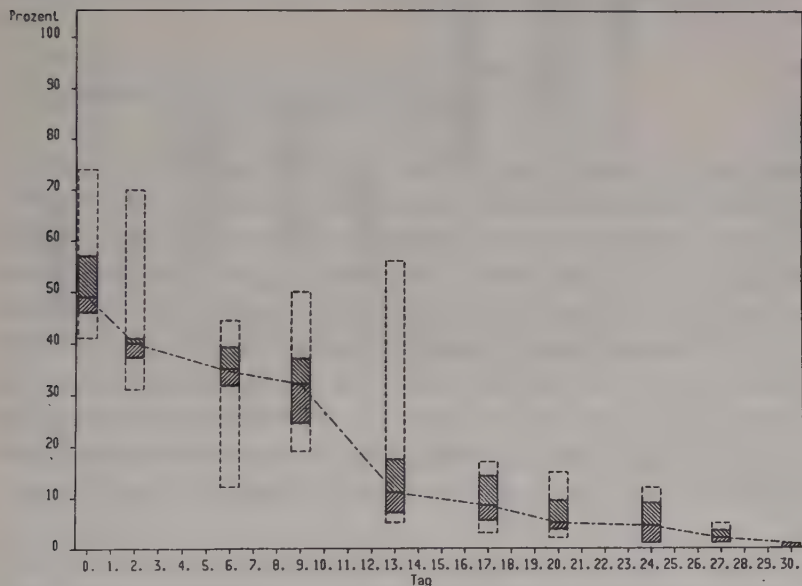


Abb. 34 Kryotherapie bei tumortragenden nu/nu NMRI Mäusen
 Abnahme der B-Lymphozyten (Ig + Zellen) in der Milz in % Gesamtzellen
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 7 (n = 12)

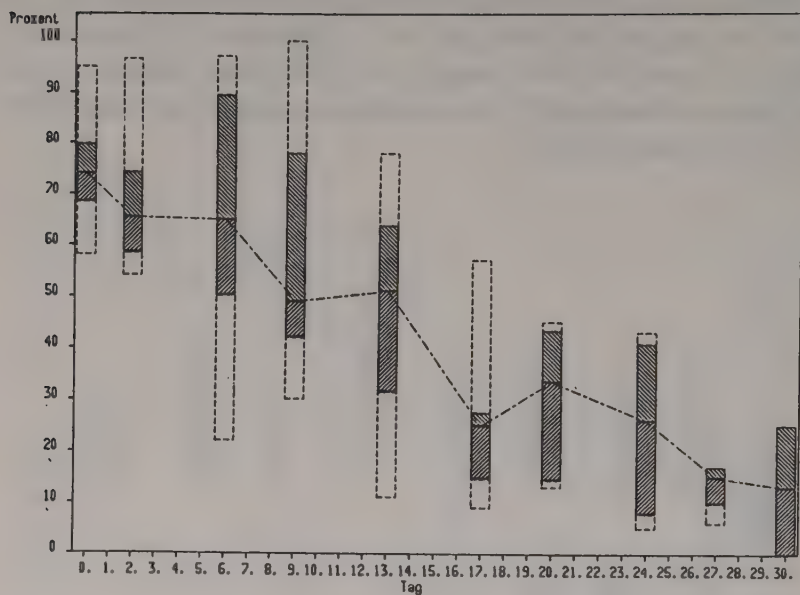


Abb. 35 Kryotherapie bei tumortragenden nu/nu NMRI Mäusen
 Abnahme der B-Lymphozyten (Ig + Zellen) in der Milz in % Lympho-
 zytengesamtpopulation (Ig + Zellen/Lymphozyten)
 Tumorinokulation an Tag 0, Kryotherapie an Tag 7 (n = 12)

D. DISKUSSION

I. DER TUMORIZIDE EFFEKT DER KRYOCHIRURGISCHEN BEHANDLUNG

Grundsätzlich liegen der Möglichkeit, durch kryochirurgische Behandlung Tumoren zu zerstören, zwei Wirkungsmechanismen zugrunde: Zum einen die direkte Vernichtung der Zellen auf physikalisch-chemischem Wege, zum anderen die indirekte über die Induktion einer systemischen Immunantwort, welche letztendlich zum Untergang des Tumorgewebes führen kann.

1. Die physikalisch-chemische Wirkung

Lebende Gewebe stellen wäßrige Systeme dar, in denen es bei Abkühlung unter den Gefrierpunkt zur Bildung von Eiskristallen kommt. Diese Kristalle nehmen ihren Ursprung von Kristallisationszentren, die entweder ausschließlich aus Molekülen der zu gefrierenden Substanz bestehen (homogene Nukleationen) oder aus in Lösung befindlichen Molekülen, die katalytisch wirkend Ersatzzentren darstellen können (heterogene Nukleationen) (45). Bei langsamem Abfall der Temperatur auf Werte, die über -40°C liegen, erhält man wenige heterogene Nukleationen, um die herum sich große Kristalle bilden. Umgekehrt entstehen bei schnellem Temperaturabfall auf Werte unter -40°C viele homogene Nukleationen, die kleine Kristalle zur Folge haben (60).

Wird einem Gewebe langsam Wärme entzogen, so kommt es auf der Basis heterogener Nukleationen zur extrazellulären Eiskristallbildung, während dieser Vorgang intrazellulär ausbleibt. Man macht dafür das Fehlen von geeigneten Kristallisationskeimen im Zellinneren verantwortlich (60). Durch Übergang von Lösungswasser in den festen Aggregatzustand steigt nun die extrazelluläre Konzentration der in der verbleibenden Flüssigkeitsmenge gelösten Moleküle an. Wasser entweicht dem osmotischen Sog folgend aus

der Zelle, die daraufhin schrumpft (25). Sobald ein sogenanntes minimales Volumen unterschritten wird, führen irreversible Membranschäden zum Tod der Zelle (61). Dieser langsame Wärmeentzug wird auch suboptimales Gefrieren genannt. Bei supraoptimalem Gefrieren mit schnellem Wärmeentzug auf Temperaturen unter -40°C entstehen durch homogene Nukleationen zahlreiche kleine Kristalle, die mit ihrer Größe von weniger als 5 nm in der Lage sind, die Zellmembran über Kanäle zu passieren und so auch intrazelluläre Eiskristallbildung zu initiieren. Die daraus resultierende Volumenzunahme führt zur mechanischen Zerstörung der Zelle und ihrer Organellen (59).

Optimale Gefrierraten, die zwischen diesen beiden Extremen liegen, bewirken zunächst eine subletale Volumenabnahme der Zelle, welche die später eintretende Volumenzunahme durch Kristallbildung kompensiert, d. h. die Zellen überleben die Vereisung.(33).

Schnelle Abkühlung auf möglichst tiefe Temperaturen und langsames Auftauen schaffen die besten Voraussetzungen, um optimales Gefrieren zu vermeiden und sicheren Zelltod zu erreichen (45, 67). Diesen beiden Bedingungen wird in den vorliegenden Versuchen mit Kühltemperaturen von -160°C und spontanem Auftauen der Tumoren entsprochen. Daß nach einmaligem Gefrieren von Gewebe dennoch Zellen überleben (20, 41), liegt daran, daß in der Umgebung zwischen dem Zentrum des Eisballs, in dem supraoptimale Gefrieren erzielt werden, und dessen Peripherie mit ihren suboptimalen Bedingungen ein Zone existiert, in der optimales Gefrieren den Zelltod verhindert (45). Anschließende Hämostase und Hypoxie im vereisten Gewebe führen jedoch zum Untergang der meisten überlebenden Zellen (41), obwohl die Tumorrezidive in den vorliegenden wie auch anderen Experimenten zeigen, daß dennoch genügend Zellen überleben und zu weiterem Tumorwachstum Anlaß geben können (20). Die Tatsache, daß die Rezidivrate bei nackten NMRI Mäusen (s. Tab.3), die offensichtlich keine adäquate Immunreaktion zustande bringen, 100% beträgt, legt sogar den Schluß nahe, daß Kryotherapie unter klinischen

Bedingungen grundsätzlich nicht in der Lage ist, alle Tumorzellen nur auf physikalisch-chemischem Wege zu vernichten, sondern vielmehr immer auch eine immunologische Komponente vonnöten ist.

2. Die Voraussetzungen der immunologischen Reaktion

Warum die Vereisung von Gewebe, insbesondere Tumorgewebe, das Immunsystem zu einer Abwehrreaktion stimulieren kann, dafür gibt es mehrere Erklärungen.

Die in situ Nekrotisierung führt einerseits zu einer Freisetzung beträchtlicher Antigenmengen, welche über die Lymph- und Blutbahnen mit dem Immunsystem in Kontakt treten können (32). Andererseits verbleiben die toten Tumorzellen im Gegensatz beispielsweise zur chirurgischen Exzision im Organismus und geben so der körpereigenen Abwehr mehr Zeit, eine Reaktion gegen den Tumor aufzubauen (68-70). Eine andere Hypothese nimmt an, daß intrazellulär gelegenen Antigene, denen normalerweise die Interaktion mit dem Immunsystem verwehrt ist, durch die Zellnekrose freigesetzt werden, oder daß Antigenstrukturen durch Vereisung modifiziert und nun von der Immunsurveillance als fremd erkannt werden (47, 68). Welche dieser Annahmen letztlich zutreffen, ist noch nicht eindeutig geklärt. Fest steht jedoch, daß die durch Kryotherapie induzierte Immunantwort für den jeweiligen Tumor hochspezifisch ist (17, 18, 31, 65).

II. VERSUCHE

1. Tumorwachstum bei Long Evans Ratten ohne Kryotherapie

Das Wachstum von Walker 256 Karzinosarkomen verändert die zelluläre Zusammensetzung der Milz von Long Evans Ratten. Einer massiven Verarmung an Lymphozyten steht die Aktivierung der Erythropoese und neutrophilen Granulopoese gegenüber. Diese Ergebnisse werden von anderen Autoren bestätigt (26, 46, 52-54, 73, 75, 82, 88), sind aber auch abhängig vom jeweils verwendeten Tumor- und Tiermodell (26). Daß die Rattenmilz, in der man unter normalen Bedingungen fast keine erythropoetischen Vorstufen findet, im finalen Stadium wieder an der Blutbildung teilnimmt, liegt möglicherweise an der parallel auftretenden Zellverarmung des Knochenmarks, dessen Aufgaben in fortgeschrittenem Tumorstadium von der Milz mitübernommen werden (73, 88). Als Ursache für die zunehmene Produktion der Milz von neutrophilen Granulozyten stehen zwei Möglichkeiten im Raum. Aus einem transplantablen Mäusetumor (CE 1460 MACA) ließ sich ein sogenannter "granulocytosis-promoting factor" extrahieren, der für die extramedulläre Granulopoese verantwortlich gemacht wird (26). Andere Arbeiten zeigen, daß zumindest in vitro neutrophile Granulozyten ähnlich wie Null- oder Killerlymphozyten imstande sind, antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität auszuüben (24, 42, 85, 86), welche antikörperbedingt tumorspezifisch ist (86). Inwiefern diese Verhältnisse in vivo eine Rolle spielen, ist bis jetzt noch unklar.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz lassen eine eingehendere Differenzierung der Verringerung des Lymphozytenanteils zu, von dem B-Lymphozyten stärker betroffen sind als T-Lymphozyten. Die relative Zunahme des T-Zell-Anteils erstreckt sich sowohl auf zytotoxische/Suppressorzellen wie auch auf Helferlymphozyten und verkörpert möglicherweise den Rest einer frustranen zellulären Immunreaktion gegen den Tumor. Allerdings ist hinzuzufügen, daß in anderen Modellen, die Mäusetumoren verwenden, die B-/T-Zell-Ratio weit-

gehend unverändert bleiben kann (52) oder sich sogar zugunsten der B-Lymphozyten verschiebt (82). Auch hier spielt also wieder die Abhängigkeit der zellulären Veränderungen vom verwendeten Versuchsmodell eine Rolle.

2. Kryotherapie von Tumoren bei Long Evans Ratten

Nach Etablierung der Kryochirurgie als Methode der Tumorthherapie wurden Fälle bekannt, in denen die Kryotherapie der Primärtumoren zu einer Remission von Fernmetastasen geführt hatte (11, 78). Immunologische Abwehrmechanismen wurden für diese Reaktion verantwortlich gemacht und konnten in Tierversuchen nachvollzogen werden. Bei Zwillingstumoren hatte die Vereisung nur einer der beiden Geschwülste die Remission der zweiten, unbehandelten zur Folge (20, 38). Kryotherapie von Mäuseosteosarkomen verringerte die Inzidenz von Lungenmetastasen verglichen mit einer Kontrollgruppe, deren Tumoren chirurgisch exzidiert worden waren (64). Challenge-Modelle, bei denen nach erfolgreicher Tumorthherapie ein zweites Mal versucht wurde, den Tieren Tumorzellen zu inokulieren, demonstrierten anhand verschiedener Parameter wie Angehrate, Tumolvolumen und Überlebenszeiten die Überlegenheit der Kryochirurgie gegenüber anderen Methoden (38, 66, 69, 70).

Eingehendere Untersuchungen der Immunreaktionen nach Kryotherapie ergaben, daß nach Tumorvereisung sowohl die humorale als auch zelluläre Komponente des Abwehrsystems betroffen sind. Die meisten klinischen Erfahrungen liegen zur Zeit mit Prostatakarzinompatienten vor. Bei ihnen kommt es nach Kryotherapie zu einer Verbesserung der zellulären Abwehrlage. Verglichen mit präoperativen Werten sinkt der α_2 Globulinspiegel im Serum, dem tumorprotektive Wirkung zugeschrieben wird, periphere Blutlymphozyten lassen sich durch Phytohämagglutinin vermehrt stimulieren, und die Leukozytenmigrationshemmung nimmt zu (14). Parallel hierzu fällt nach Kryotherapie der

Titer zirkulierender Antikörper im Serum ab (8, 10), da diese Immunglobuline sich an Antigenstrukturen der Tumorzellen binden (10). Auch an Tumorzellen von Rektumkarzinompatienten wurden nach Kryotherapie angelagerte IgM-Antikörper nachgewiesen, deren Anstieg mit günstigem klinischen Verlauf korreliert (13).

Tierversuche konnten diese Daten bestätigen (28, 29, 63). Sie erlaubten darüber hinaus noch differenziertere Aussagen über den Vergleich mit anderen Methoden und die Spezifität der Immunantwort. So manifestierte sich in Zytotoxizitätstests die nach Kryotherapie von Mäusetumoren gesteigerte tumorizide Wirkung von Milzlymphozyten und Serum gegenüber geringeren Werten bei Elektrokauterisierung und chirurgischer Exzision (17, 18, 31, 32). Diese Reaktionen sind für den jeweils verwendeten Tumor spezifisch (17, 18, 31, 65, 71) und finden in erster Linie in der Milz statt, deren Größe nach Tumorvereisung zunimmt (30). Milzlymphozyten sind im Gegensatz zu Thymuslymphozyten auch imstande, Tumormunität bei Transferversuchen von kryotherapierten auf unbehandelte Tiere zu übertragen (38, 71).

Die eigenen Ergebnisse zeigen, daß bei Ratten kein Lymphozytenabfall und kein Anstieg der neutrophilen Granulozyten und erythropoetischen Vorstufen auftreten, wenn die Walker 256 Tumoren durch Kryotherapie zur Totalremission kommen. Während des gesamten Versuches bleibt der Lymphozytenanteil bei Werten um 90%, während die Tiere mit Rezidiven denselben Verlauf nehmen wie tumortragende Ratten ohne Therapie. Innerhalb der Lymphozytenpopulation treten Verschiebungen zugunsten der zytotoxischen/Suppressorzellen auf, die am 4. Tag nach Tumorvereisung ihr Maximum erreichen. Dies legt den Schluß nahe, daß diese Subpopulation für die Tumorabstoßung verantwortlich ist, indem sie in der Milz gebildet wird, diese verläßt und von dort über die Blutgefäße zu den Tumorzellen wandert.

Eine andere Arbeit, in der Milzzellen von Mäusen nach Tumorvereisung mit

radioaktivem H_3 -Thymin inkubiert wurden, belegt einen Proliferationsgipfel von Milzlymphozyten am 3. Tag nach Kryotherapie (49), der für die Verschiebung der Lymphozytensubpopulationen verantwortlich sein könnte. Die durch den Ox 8-Antikörper markierte Subpopulation, deren Bedeutung hinsichtlich der Tumorbewehr zuvor hervorgehoben wurde, ist jedoch heterogen und setzt sich wiederum aus zwei Untergruppen zusammen, die verschiedene Funktionen ausüben: Zytotoxische Lymphozyten, die spezifische, tumorizide Wirkung besitzen können und Suppressorlymphozyten, die imstande sind, Immunreaktionen selektiv zu unterdrücken. In einem Mausmodell korreliert die Suppressoraktivität in der Milz mit der für erfolgreiches Tumorchallenge notwendigen Dosis an Tumorzellen nach Kryotherapie und chirurgischer Exzision. Ab dem 4. Tag nach dem Eingriff ist hier die Kryochirurgie der chirurgischen Exzision überlegen (83, 84). Dies legt zusammen mit dem Wissen um die zuvor erwähnten Funktionen der Ox 8-Untergruppen nahe, den Therapieerfolg nach Kryotherapie der Proliferation und Wirkung zytotoxischer Lymphozyten zuzuschreiben.

Einige Veröffentlichungen deuten an, daß Kryochirurgie nicht immer erfolgreiche Abwehrreaktionen im Immunsystem gegen Tumoren induziert, sondern unter Umständen sogar gegenteilige Wirkung erzielen kann (43, 48, 50, 62, 92). Für diese Ambivalenz können folgende Erklärungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden: Kryochirurgie zieht ebenso wie jeder andere chirurgische Eingriff eine postoperative Immunsuppression in Zusammenhang mit dem bekannten Postaggressionssyndrom nach sich (1, 2, 9). Gerade bei kleineren Tieren mag die nicht unerhebliche Absenkung der Körperkern-temperatur nach Kryotherapie größeren Operationsstreß bedeuten als nur die Exzision eines subkutanen Tumorknotens ohne Eröffnung von Thorax oder Abdomen (58). Klinische Studien an Prostata- und Mundhöhlenkarzinompatienten belegen die bessere Wirksamkeit der Kryochirurgie in frühen Stadien der Tumorerkrankung, wobei gute zelluläre Abwehrkraft und hohe IgM-Antikörperspiegel mit günstigem Krankheitsverlauf verknüpft sind (4, 34, 35,

36, 81). Patienten mit schwacher Lymphozytenstimulierbarkeit und hohen IgE-Spiegeln haben schlechte Prognosen aufzuweisen (87). Aufgrund dieser Zusammenhänge sollte vor Einsatz der Kryochirurgie als kurativer Therapiemethode eine sorgfältige Untersuchung des Immunstatus - das sogenannte "Immunostaging" - des Patienten erfolgen (3, 4, 12).

Es ist bekannt, daß die Antikörper des humoralen Immunsystems keineswegs immer nur tumorizide Wirkung besitzen, sondern eine effiziente Tumorabwehr als "blocking factors" sogar unterdrücken können und so eine Vergrößerung der Tumormassen, das "tumor enhancement", bewirken. Dies geschieht, indem sich Antikörper an auf dem Tumor befindliche Antigene anlagern und ihn so immunologisch modulieren oder indem sie mit freien Tumorantigenen eine Verbindung eingehen und Antigen-Antikörper-Komplexe bilden, die das Immunsystem paralisieren (44). Manche Autoren schließen daraus, daß eine Remission des vereisten Tumors und eventuell auch seiner Metastasen mit einer starken zellulären Abwehrreaktion verknüpft ist, während humorale Prozesse zu einer Behinderung der Tumorabwehr führen (4, 50). Eine mögliche Erklärung für dieses Umschlagen der Immunreaktion wird darin gesehen, daß freigesetztes Antigenmaterial das Immunsystem nur bis zu einer bestimmten Schwelle hin positiv stimulieren kann, und eine Überschreitung dieser Schwelle das Immunsystem durch Antigenüberschuß blockiert (20, 58).

Zuletzt ist noch zu erwähnen, daß im Tierversuch Erfolg oder Mißerfolg der Kryochirurgie auch von den jeweils verwendeten Tier- und Tumormodellen abhängen können. Nicht alle Spezies reagieren gleich und begrenzen somit auch die Übertragbarkeit auf den Menschen (92).

3. Kryotherapie von Tumoren bei nu/nu NMRI Mäusen und +/+ NMRI Mäusen

Aus der Unfähigkeit nackter Mäuse, nach Kryotherapie Lewis Lung Karzinome abzustoßen, gegenüber behaarten Mäusen derselben Linie, bei denen Tumoreiseung in allen Fällen zur Totalremission geführt hat, lassen sich mehrere Schlüsse ziehen: Zum einen kann man angesichts einer Rezidivrate von 100% davon ausgehen, daß bei einmaliger Vereisung unter den vorgelegenen Bedingungen immer genügend vitale Tumorzellen am Leben bleiben, um weiteres Tumorwachstum zu ermöglichen (s. D.I.1.). Zum anderen ergibt sich zwangsläufig, daß ohne funktionierendes T-Zell-System nur mit humoraler Abwehr eine immunologische Vernichtung von Tumoren nach Kryotherapie unmöglich ist. Dies entspricht den Ergebnissen des im vorhergehenden Abschnitt diskutierten Versuchs, die den zytotoxischen T-Lymphozyten die Hauptrolle bei der Tumorerstörung nach Vereisung zuschreiben.

Die zelluläre Zusammensetzung der Milz unter Tumorwachstum ähnelt der von Long Evans Ratten, die Walker 256 Karzinom tragen: Massiver Abfall der Lymphozyten, Aktivierung der Granulopoese. Daß die Erythropoese nicht zunimmt, liegt vielleicht daran, daß schon unter physiologischen Verhältnissen die Milz der nackten Maus an der Blutbildung beteiligt ist (Erythropoetische Vorstufen vor Tumorinokulation: 18,5%). Abgesehen davon ist die Qualität der Zellveränderungen in der Milz auch vom verwendeten Tumor- und Tiermodell abhängig (26).

In der Immunfluoreszenz beobachtet man innerhalb der Lymphozytengruppe die relative Zunahme einer Subpopulation, die nicht aus B-Lymphozyten besteht. Es ist zu vermuten, daß es sich hierbei um Natural-Killer- oder Killer-Lymphozyten handelt, von denen bekannt ist, daß sie in der nackten Maus vorkommen und auch einen gewissen Beitrag zur Abwehr von Tumoren leisten (16, 37), der jedoch im Fall der vorliegenden Versuche offensichtlich nicht ausreicht, um eine Remission der Tumoren hervorzurufen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In den vorliegenden Experimenten wurde der Einfluß der Kryochirurgie auf Tumorwachstum und zelluläre Zusammensetzung der Milz von Ratten und nackten Mäusen untersucht.

Tumorwachstum bei unbehandelten Ratten führt zu einer Verarmung der Milz an Lymphozyten sowie zu einer Aktivierung der Granulo- und Erythropoese. Innerhalb der Lymphozytenpopulation fallen die B-Zellen ab, Helfer- und zytotoxische/Suppressorzellen nehmen zu.

Kryotherapie der Rattentumoren bewirkte bei 13 von 18 Tieren eine Totalremission der Tumoren und verhinderte tumorbedingte Veränderungen der Milzzellpopulationen. Der Anstieg der Subpopulation der zytotoxischen/Suppressorzellen mit Maximum am 4. Tag nach Vereisung weist auf die funktionelle Bedeutung dieser Lymphozyten bei der Tumorabstoßung hin.

Nackte Mäuse sind im Gegensatz zu behaarten Mäusen nicht in der Lage, nach Kryotherapie Tumoren abzustößen. Ein funktionierendes T-Zell-System ist zur Abwehr von Tumoren durch Vereisung unabdingbar.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ablin, R.J., G.R. Bruns, P.D. Guinan, N. Sadoughi, H. al Sheik I.M. Bush:
Alterations in host responsiveness in patients with prostatic cancer
following cryosurgery or transurethral resection.
Amer Surg 43: 144 - 150 (1977)
2. Ablin, R.J., N. Sadoughi, P.D. Guinan, G.R. Bruns, I.M. Bush:
Biphasic effect of cryosurgery of the prostate on lymphocyte proliferation.
Cryobiology 14: 60 - 67 (1977)
3. Ablin, R.J., G. Fontana, B. Helpap:
Cryoimmunotherapy: A conference report.
Eur Surg Res 14: 309 - 316 (1982)
4. Ablin, R.J., G. Fontana and the Cryoimmunotherapeutic Study Group:
Cryoimmunotherapy: Continuing studies toward determining a rational
approach for assessing the candidacy of the prostatic cancer patient for
cryoimmunotherapy and postoperative responsiveness. An interim report.
Eur Surg Res 11: 223 - 233 (1979)
5. Ablin, R.J. and the Cryoimmunotherapeutic Study Group:
Cryosensitivity. Factors influencing development of immunologic response
following cryosurgery of prostate.
Urology 5: 317 - 321 (1975)
6. Ablin, R.J., R.V. Jagodzinski, C. (Kostrzewski) Prox, R.W. Williams,
M.J. Gonder, W.A. Soanes:
Cryosurgery of the monkey (Macaque) prostate.
I. Humoral immunologic responsiveness following cryostimulation.
Cryobiology 13: 47 - 53 (1976)

7. Ablin, R.J., K.P. Reddy:
Cryosurgery of the monkey (Macaque) prostate
II. Apparent immunopathologic alterations following cryostimulation
Cryobiology 14: 205 - 214 (1977)
8. Ablin, R.J., M.J. Gonder, W.A. Soanes:
Elution of cell-bound anti-prostatic epithelial antibodies after multiple
cryotherapy of carcinoma of the prostate.
Cryobiology 11: 218 - 221 (1974)
9. Ablin, R.J., P.D. Guinan, G.R. Bruns, H. al Sheik, N. Sadoughi, I. Bush:
Evaluation of cellular immunologic responsiveness in the clinical manage-
ment of patients with prostatic cancer.
II. Effect of oestrogen, cryosurgery and transurethral resection on thymic-
dependent lymphocytic blastogenesis.
Urol Int 31: 383 - 400 (1976)
10. Ablin, R.J., M.J. Gonder, W.A. Soanes:
Immunohistologic studies of carcinoma of the prostate.
III. Elution of interepithelial antibodies from carcinomatous human
prostatic tissue following cryoprostatectomy.
Oncology 29: 329 - 334 (1974)
11. Ablin, R.J., W.A. Soanes, M.J. Gonder:
Prospects for cryoimmunotherapy of metastasizing carcinoma of the
prostate
Cryobiology 8: 271 - 279 (1971)
12. Ablin, R.J. and the Cryoimmunotherapeutic Study Group:
A rational approach toward determining the candidacy of the prostatic
cancer patient for cryoimmunotherapy. An interim report.
Eur Surg Res 8: 481 - 488 (1976)

13. Ablin, R.J., W.A. Soanes, M.J. Gonder:
Serum proteins in prostatic cancer.
VI. Alterations in immunoglobulins and clinical responsiveness following cryoprostectomy.
Urol Int 32: 56 - 64 (1977)
14. Ablin, R.J.:
Serum proteins in prostatic cancer.
VI. Reduction of the suppressive ('blocking?') properties of serum on in vitro parameters of cell-mediated immunologic responsiveness following cryosurgery.
Urol Int 32: 65 - 73 (1977)
15. American College of Laboratory Animal Medicine Series
The Laboratory Rat
Eds.: H.J. Baker, J.R. Lindsey, S.H. Weisbroth
Academic Press 1979 New York
16. American College of Laboratory Animal Medicine Series
The Mouse in Biomedical Research
Eds.: H.L. Foster, J.D. Small, J.G. Fox
Academic Press 1981 New York
17. Bagley, D.H., R.P. Faraci, J.C. Marrone, R.M. Beazley:
Lymphocyte mediated cytotoxicity after cryosurgery of a murine sarcoma.
J Surg Res 17: 404 - 406 (1974)
18. Bagley, D.H., R.P. Faraci:
Tumor immunity following cryosurgery or electrocauterization.
Nat'l Canc Inst Monogr 49: 371 - 373 (1978)

19. Bamat, J., B. Sordat, R.K. Lees, P. Zaech, R. Ceredig, H.R. MacDonald:
Development and localization of 'T-like' cells in the nude mouse.
Expl Cell Biol 52: 25 - 29 (1984)
20. Blackwood, C.E., I.S. Cooper:
Response of experimental tumor systems to cryosurgery.
Cryobiology 9: 508 - 515 (1972)
21. Brandt, E.J., C. Riera, F. Orsini, S. Shulman:
Cryoimmunology: The booster phenomenon.
Cryobiology 3: 382 - 383 (1967)
22. Brideau, R.J., P.B. Carter, W.R. McMaster, D.W. Mason, A.F. Williams:
Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies.
Eur J Immunol 10: 609 - 615 (1980)
23. Bronson, P., C. Yantorno, C. Riera, S. Shulman:
Cryoimmunology: The molecular classes in the antibody response.
Cryobiology 3: 382 (1967)
24. Cameron, D.:
A comparison of the cytotoxic potential in polymorphonuclear leukocytes
obtained from normal donors and cancer patients.
Clin Immunol Immunopathol 28: 115 - 124 (1983)
25. Cooper, I.S.:
Cryogenic surgery: A new method of destruction or extirpation of benign
or malignant tissues.
N Engl J Med 268: 743 - 749 (1963)

26. Delmonte, L., A.G. Liebelt, R.A. Liebelt:
Granulopoiesis and thrombopoiesis in mice bearing transplanted mammary cancer.
Cancer Res 26: 149 - 159 (1966)
27. Demmel, N., J. Koller, H. Denecke, P. Dirschedel:
Stellenwert der Kryochirurgie. Palliative und alternative Behandlungsmöglichkeit beim Rektumkarzinom.
MMW 128: 555 - 559 (1986)
28. Eskandari, H., R.A. Bhatti, R.L. Vieth, P.D. Guinan, W.V. Condoulis, R.J. Ablin:
Effect of cryosurgery on anti-tumor cell-mediated immunity.
Cryobiology 15: 726 (1978)
29. Eskandari, H., R.J. Ablin, R.A. Bhatti:
Immunologic responsiveness & tumor growth of the Dunning R3327 rat prostatic adenocarcinoma following cryosurgery & orchiectomy.
Indian J Exp Biol 20: 872 - 874 (1982)
30. Faraci, R.P., D.H. Bagley, J.C. Marrone, R.M. Beazley:
The effect of curative cryosurgery on the tumorspecific immune response of C57 mice.
Cryobiology 12: 175 - 179 (1975)
31. Faraci, R.P., D.H. Bagley, J.C. Marrone, R.M. Beazley:
In vitro demonstration of cryosurgical augmentation of tumor immunity.
Surgery 77: 433 - 438 (1975)

32. Faraci, R.P., D.H. Bagley, J.C. Marrone, A.S. Ketcham, R.M. Beazley:
Mechanisms of heightened tumor immunity induced by cryosurgery.
Am Surg 41: 309 - 311 (1975)
33. Farrant, J., C.A. Walter, H. Lee, L.E. McGann:
Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell
survival following freezing and thawing.
Cryobiology 14: 273 - 286 (1977)
34. Fazio, M., M. Airoidi, V. Mastromatteo, L. Negri, S. Gandolfo, D. Furlani:
Cryosurgery as a stimulator of the host's immune defences in benign and
malignant oral cavity tumours.
Panminerva Med 24: 195 - 201 (1982)
35. Fazio, M., M. Airoidi, S. Gandolfo, V. Mastromatteo, L. Negri, F. Pecchio,
S. Sartoris:
Humoral and cellular immune response to cryosurgery of benign and
malignant lesions in the oral cavity.
Boll Soc Ital Biol Sper 58: 412 - 418 (1982)
36. Fazio, M., M. Airoidi, D. Camoletto, P. Cavallero, V. Mastromatteo,
L. Negri, F. Pecchio:
Secondary immunologic response to cryosurgery in various stages of oral
cavity neoplasms.
Boll Soc Ital Biol Sper 58: 419 - 424 (1982)
37. Fogh, J., B.C. Giovanella:
The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research.
Academic Press 1978 New York

38. Ganghoff, O., G. Feifel, C. Hammer, W. Brendel:
Einfluß der Kryochirurgie auf die Tumorabwehr.
Chirurgisches Forum '82 für experimentelle und klinische Forschung:
105 - 109
Hrsg.: S. Weller
Springer Berlin, Heidelberg, New York 1982
39. Ganghoff, O., C. Lersch, N. Demmel, C. Hammer:
Stimulation der Immunabwehr bei Patienten mit Rectumkarzinom durch
Kryochirurgie.
Chirurgisches Forum '84 für experimentelle und klinische Forschung:
269 - 271
Hrsg.: L. Koslowski
Springer Berlin, Heidelberg 1984
40. Goding, J.W.:
Conjugation of antibodies with fluorochromes: Modification to the
standard methods.
J Immunol Methods 13: 215 - 226 (1976)
41. Goldenberg, D.M., A. Sigel, K.M. Schrott, V. Ward:
Cryotherapy of heterotransplanted human cancer: Preliminary findings in
the syrian goldhamster.
Urol Int 24: 166 - 176 (1969)
42. Hafeman, D.G., Z.J. Lucas:
Polymorphonuclear leukocyte-mediated, antibody-dependent cellular
cytotoxicity against tumor cells: Dependence on oxygen and the
respiratory burst.
J Immun 123: 55 - 62 (1979)

43. Holbrook, R., J. Van der Stoep, E. Nieuwe, & T. van der Stoep, M. Nieuwe, & J. van der Stoep.
Comparative immunological studies in 120 growing mice, aged and single sexed of 3 MC2 mixed primary and secondary tumor.
Cancer 73: 480-489 (1982)
44. Holbrook, R., & J. van der Stoep, E. Nieuwe, & J. van der Stoep.
Staining of cell-mediated tumor immunity by cells from parents with growing neoplasms.
Int. J. Cancer 7: 226-237 (1971)
45. Holbrook, R.
Der Cryobiologische Eingriff und seine Folgen.
in: Normale und pathologische Anatomie Band 40
Eds. W. Jönn, H. Leonhard.
Thieme Stuttgart, New York 1982.
46. Kough, R. L., W. C. Hubbard, & J. D. Jones.
CX carcinoma, pulmonary metastases and neoplasia in the lungs.
Am. J. Path. 112: 231-237 (1983)
47. Kouchak, R., E. J. van der Stoep, & J. van der Stoep.
An experimental system for the production of neoplasia in response to
chemical carcinogens.
Carcinogenesis 3: 456-463 (1982)
48. Kouchak, R., & J. van der Stoep, E. J. van der Stoep.
Failure of cryosurgical treatment of experimentally induced tumors to
eradicate metastatic lymph node metastases in 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100.
Int. J. Cancer 62: 1479-1481 (1978)

49. Kimura, H.:
Comparative immunological studies on cryosurgery and surgical operation using Moloney murine sarcoma virus-induced primary tumors in BALB/c mice.
Gann 69: 507 - 515 (1978)
50. Kobayashi, H., T. Yamashita:
Immunological enhancement of tumor metastases in rats by cryosurgery
Cryobiology 15: 702 - 703 (1978)
51. Köhler, G., C. Milstein:
Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.
Eur J Immunol 6: 511 - 519 (1976)
52. Lee, M.Y., C. Rosse:
Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis-inducing mammary carcinoma.
Cancer Res 42: 1255 - 1260 (1982)
53. Lersch, C., C. Hammer, M. Thiel, W. Brendel:
Fine needle aspiration cytology of the spleen of tumor bearing mice.
J Immunol Methods 66: 307 - 312 (1984)
54. Lersch, C., C. Hammer, M. Thiel, W. Brendel:
Fluktuation von immunkompetenten Zellen in Mäusemilzen unter Tumorstadium - in vivo Monitoring durch Feinnadelaspirationszytologie.
Chirurgisches Forum '84 für experimentelle und klinische Forschung:
265 - 267
Hrsg.: L. Koslowski
Springer Berlin, Heidelberg 1984

55. Lewis, M.R., W.H. Cole:
Experimental increase of lung metastases after operative trauma
(Amputation of limb with tumor)
Arch Surg 77: 621 - 626 (1958)
56. Mason, D.W., S.J. Simmonds, R.A.H. White:
Failure to demonstrate allotype specific cells for antibody production in
the rat.
Nature 267: 440 (1977)
57. McMaster, W.R., A.F. Williams:
Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat
spleen.
Eur J Immunol 9: 426 - 433 (1979)
58. Matsumura, K., K. Sakata, S. Saji, A. Misao, T. Kunieda:
Antitumor immunologic reactivity in the relatively early period after
cryosurgery: Experimental studies in the rat.
Cryobiology 19: 263 - 272 (1982)
59. Mazur, P.:
The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supra-
optimal rates.
Cryobiology 14: 251 - 272 (1977)
60. Meryman, H.T.:
Mechanism of freezing in living cells and tissues.
Science 124: 515 - 521 (1956)

61. Meryman, H.T., R.J. Williams, M.S.J. Douglas:
Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection.
Cryobiology 14: 287 - 302 (1977)
62. Misao, A., K. Sakata, S. Saji, T. Kunieda:
Late appearance of resistance to tumor rechallenge following cryosurgery.
A study in an experimental mammary tumor of the rat.
Cryobiology 18: 386 - 389 (1981)
63. Moore, F.T., J. Blackwood, L. Sanzenbacher, W.G. Pace:
Cryotherapy of malignant tumors: Immunologic response.
Arch Surg 96: 527 - 529 (1968)
64. Müller, L.C., M. Micksche, S. Yamagata, F. Kerschbaumer:
Therapeutic effect of cryosurgery of murine osteosarcoma - Influence on disease outcome and immune function.
Cryobiology 22: 77 - 85 (1985)
65. Myers, R.S., W.G. Hammond, A.S. Ketcham:
Tumor-specific transplantation immunity after cryosurgery.
J Surg Oncol 1: 241 - 246 (1969)
66. Neel, H.B., A.S. Ketcham, W.G. Hammond:
Comparison of tumor immunity after complete excision, cryonecrosis, and in the presence of tumor.
Surg Forum 21: 120 - 122 (1970)
67. Neel, H.B., L.W. de Santo:
Cryosurgical control of cancer: Effects of freeze rates, tumor temperatures and ischemia.
Ann Otol 82: 716 - 723 (1973)

68. Neel, H.B., A.S. Ketcham, W.G. Hammond:
Experimental evaluation of in situ oncocide for primary tumor therapy:
Comparison of tumor-specific immunity after complete excision, cryo-
necrosis and ligation.
Laryngoscope 83: 376 - 387 (1973)
69. Neel, H.B., R.E. Ritts:
Immunotherapeutic effect of tumor necrosis in situ.
Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol 84: 285 - 290 (1977)
70. Neel, H.B.:
Immunotherapeutic effect of cryosurgical tumor necrosis.
Vet Clin North Am 10: 763 - 769 (1980)
71. Neel, H.B., R.E. Ritts:
Transfer of tumor-specific immunity with syngeneic spleen cells and serum
from mice that have large tumors and metastases.
Cancer 40: 1643 - 1649 (1977)
72. Petersen, D.S., L.A. Milleman, E.F. Rose, W.W. Bonney, J.D. Schmidt,
C.E. Hawtrey, D.A. Culp:
Biopsy and clinical course after cryosurgery for prostatic cancer.
J Urol 120: 308 - 311 (1978)
73. Ray, M.R., J.R. Chowdhury:
Erythropoiesis in mice with chemically induced tumor.
Arch Geschwulstforsch 55: 161 - 165 (1985)
74. Reddy, K.P., R.J. Ablin:
Immunologic and morphologic effects of cryosurgery of the monkey
(Macaque) prostate
Res Exp Med 175: 123 - 138 (1979)

75. Reincke, U., H. Burlington, A.L. Carsten, E.P. Cronkite, J.A. Laissue:
Hemopoietic effect in mice of a transplanted, granulocytosis-inducing
tumor.
Exp Hematol 6: 421 - 430 (1978)
76. Sandoz
Atlas of Hematology
Published by Sandoz 1973 second edition, Basel
77. Simpson-Herren, L., A.H. Sanford, J.P. Holmquist:
Cell population kinetics of transplanted and metastatic Lewis lung
carcinoma.
Cell Tissue Kinet 7: 349 - 361 (1974)
78. Soanes, W.A., R.J. Ablin, M.J. Gonder
Remission of metastatic lesions following cryosurgery in prostatic cancer:
Immunologic considerations.
J Urol 104: 154 - 159 (1970)
79. Stewart, H.L., K.C. Snell, L.J. Dunham, S.M. Schlyen:
Transplantable and Transmissible Tumors of Animals.
Atlas of Tumor Pathology Section XII - Fascicle 40
Washington 1959
80. Stites, D.P.:
Clinical Laboratory Methods for Detection of Antigens and Antibodies.
in:
D.P. Stites, J.D. Stobo, H.H. Fudenberg, J.V. Wells:
Basic and Clinical Immunology.
Lange Medical Publications fourth edition 1982 Los Altos

81. Tanaka, S.:
Immunological aspects of cryosurgery in general surgery.
Cryobiology 19: 247 - 262 (1982)

82. Thiel, M., C. Lersch, C. Hammer, F. Krombach, F. Schödel, P. Lenz,
W. Brendel:
Chemilumineszenz (CL) und Morphologie von Milzzellen in Mäusen unter
Tumorstadium.
Chirurgisches Forum '85 für experimentelle und klinische Forschung:
85 - 88
Hrsg.: F. Stelzner
Springer Berlin, Heidelberg 1985

83. Tomiyama, S., M. Okuda, K. Sakaguchi, S. Kawabori:
Immunological study of cryosurgery. Animal experiment I.
Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi 15: 1091 - 1097 (1980)

84. Tomiyama, S., Y. Sakaguchi, M. Okuda:
Immunological study of cryosurgery. Animal experiment II:
Evidence of proliferation of suppressor T-cells four days after cryosurgery
in murine syngeneic tumor systems.
Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi 17: 1003 - 1008 (1982)

85. Tsunawaki, S., H. Oshima, D. Mizuno, M. Yamazaki:
Induction of polymorphonuclear leukocyte-mediated cytotoxicity by wheat
germ agglutinin and antitumor antibody.
Gann 74: 258 - 264 (1983)

86. Tsunawaki, S., M. Ikenami, D. Mizuno, M. Yamazaki:
Mechanism of lectin and antibody-dependent polymorphonuclear
leukocyte-mediated cytotoxicity.
Gann 74: 265 - 272 (1983)

87. Ueda, K., K. Ohtaguro, H. Washida, H. Jinno, N. Fushimi, T. Masegi:
Humoral immunity following double freezing of the prostate of patients
with prostatic cancer.
Biomedical Thermology: 815 - 826
Alan Liss Inc. 1982 New York
88. Weinberg, S.R., D.F. Gruber, E.D. Exum, G.D. Ledney:
Modulations in mouse hemopoiesis after engraftment with Lewis lung
carcinoma cells.
Exp Cell Biol 53: 252 - 259 (1985)
89. Weiss, M.L., F. Hess:
Splenic transposition with ligation of the vascular pedicle in rodents.
Immunological consequences.
Eur Surg Res 10: 283 - 289 (1978)
90. Wilcoxon, F., A. Wilcox:
Some Rapid Approximate Statistical Procedures
Lederle Laboratories, Pearl River, New York 1964
91. Williams, A.F., G. Galfré, C. Milstein:
Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma hybrid antibodies:
Differentiation antigens on rat lymphocytes.
Cell 12: 663 - 673 (1978)
92. Yamashita, T., K. Hayakawa, M. Hosokawa, T. Kodama, N. Inoue,
K. Tomita, H. Kobayashi:
Enhanced tumor metastases in rats following cryosurgery of primary
tumor.
Gann 73: 222 - 228 (1982)

93. Zappi, E., M. Nemirovsky, S. Shulman:
Cellular and humoral responses of autosensitized rabbits to a testis cryo-
injury.
Immunology 26: 477 - 488 (1974)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Brendel danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Institut für chirurgische Forschung.

Herrn Dr. med. C. Lersch danke ich für die zuverlässige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. C. Hammer, der mir jederzeit mit kompetentem Rat und motivierendem Gespräch zur Seite stand.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen danke ich für ihre tätige Mithilfe bei den Versuchen.

Der Fa. Staticon/Lochham danke ich für die rechnergestützte statistische Auswertung der Arbeit.

Herrn Dr. K. H. Oroszy und der Fa. Siemens/München danke ich für ihre Hilfe bei der Erstellung der computergezeichneten Diagramme.

Frl. C. Govekar, der Sekretärin meines Vaters, danke ich für das sorgfältige Schreiben der Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mich über die gesamte Zeit meines Studiums und insbesondere meiner Promotion ideell und materiell unterstützend begleitet hat.

LEBENS LAUF

05.02.1959 Geboren in München als Sohn des Dipl. Ing. Rudolf Römisch und seiner Ehefrau Johanna, geb. Jopp.

Schulbildung

1965 - 1969 Volksschule an der Stuntzstraße
München.
1969 - 1978 Humanistisches Wilhelmsgymnasium
München.
1978 Abitur.

Hochschulstudium

1978 - 1985 Studium der Humanmedizin an der
Technischen Universität München.
1985 Approbation als Arzt.
1983 - 1987 Doktorand am Institut für chirurgische
Forschung der Ludwig-Maximilians-Uni-
versität München-Großhadern.

Berufliche Tätigkeit

1986 - 1987 Wissenschaftlicher Assistent der chirurgi-
schen Klinik der Medizinischen Einrich-
tungen der Universität Köln.
Seit 1987 Wissenschaftlicher Assistent der Frauen-
klinik der Ludwig-Maximilians-Universität
München-Großhadern

